

**CA²⁺ - UND KOFFEIN-INDUZIERTE MECHANISCHE OSZILLATIONEN IN
ISOLIERTEN SKELETTMUSKELFASERN UND IHRE BEEINFLUSSUNG
DURCH EINEN ENDOGENEN FAKTOR**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Annegret Herrmann

Bochum 1987



**CA²⁺ - UND KOFFEIN-INDUZIERTE MECHANISCHE OSZILLATIONEN IN
ISOLIERTEN SKELETTMUSKELFASERN UND IHRE BEEINFLUSSUNG
DURCH EINEN ENDOGENEN FAKTOR**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Annegret Herrmann

Bochum 1987

Datum der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1987

Referent: Prof. Dr. H. Ch. Lüttgau

Korreferent: Prof. Dr. H. Langer

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1 Oszillatorische Phänomene in Herzmuskel- präparaten	4
1.2 Oszillatorische Vorgänge in isolierten Ske- lettmuskelfasern	8
1.3 Die Wirkung von Koffein auf die Skelettmus- kulatur	14
1.4 Ausblick auf die vorliegende Arbeit	20
2. <u>Material und Methoden</u>	22
2.1 Messung isometrischer Spannungsänderungen und unterschwelliger Sarkomeroszillationen	22
2.1.1 Präparation und Meßtechnik	22
2.1.2 Lösungen	25
2.1.2.1 Extrazelluläre Lösungen	25
2.1.2.2 Intrazelluläre Lösungen	27
2.2 Biochemische Methoden zur Analyse eines vom Muskel freigesetzten Materials	31
2.2.1 Gewinnung und Aufarbeitung des zu untersu- chenden Materials	32
2.2.2 Gelfiltrations-Chromatographie: Abtrennung des Koffeins	32
2.2.3 "Reversed phase"-Chromatographie: Auftrennung des Materials in verschiedene Komponenten	33
2.2.4 Bestimmung funktioneller Gruppen	34
2.2.4.1 Phosphat-Bestimmung	34
2.2.4.2 Nachweis freier Aminogruppen	35
2.2.5 PTC-Aminosäure-Analyse	35
2.3 Versuchsauswertung	36
2.3.1 Messung der Sarkomerlänge	36

	Seite
2.3.2	Frequenzanalyse der Lichtsignale 40
2.3.3	Bestimmung der freien Ca^{2+} -Konzentration 43
3.	<u>Ergebnisse</u> 46
3.1	Sarkomeroszillationen in der intakten Skelettmuskelfaser 46
3.1.1	Standardbedingungen für das Auftreten von Sarkomeroszillationen 46
3.1.2	Laserlichttechnische Messung der Sarkomeroszillationen 48
3.1.3	Die Wirkung Koffein-ähnlicher Methylxanthine 54
3.1.4	Die Abhängigkeit der Oszillationen von der Sarkomerlänge 58
3.1.5	Der Einfluß des Membranpotentials 64
3.1.6	Die Wirkung von Pharmaka, welche die Ca^{2+} -Freisetzung modifizieren 69
3.1.7	Die potenzierende Wirkung von Lidocain auf die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung 77
3.1.8	Der Einfluß der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration 79
3.2	Ca^{2+} - und Koffein-induzierte Oszillationen in der enthäuteten Skelettmuskelfaser 83
3.2.1	Koffein-induzierte Spannungsozillationen in Abhängigkeit von der freien Ca^{2+} -Konzentration 86
3.2.2	Sarkomeroszillationen und Spannungsozillationen bei einer erniedrigten freien Mg^{2+} -Konzentration 90
3.2.3	Zerstörung der SR-Membranen durch Triton X-100 94
3.3	Untersuchungen zur Charakterisierung eines vom oszillierenden Muskel freigesetzten "Modulators": Aufreinigung der Substanz und Überprüfung der Aktivität 98
3.3.1	Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials 99

	Seite
3.3.2 Trennung des freigesetzten Materials von Koffein	102
3.3.3 Auftrennung des freigesetzten Materials in verschiedene Komponenten	104
3.3.4 Bestimmung funktioneller Gruppen	112
3.3.5 PTC-Aminosäure-Analyse	114
4. <u>Diskussion</u>	119
4.1 Auslösung von Sarkomeroszillationen durch Koffein und verwandte Methylxanthine in intakten Skelettmuskelfasern	119
4.2 Pharmakologische Beeinflussung Koffein-induzierter Sarkomeroszillationen	122
4.3 Ca^{2+} - und Koffein-induzierte Sarkomer- und Spannungsozillationen in enthäuteten Skelettmuskelfasern	126
4.4 Freisetzung und Aufreinigung eines die Muskelfaser aktivierenden endogenen Faktors	130
4.5 Modell zur zyklischen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum unter Einbeziehung einer Modulators substanz	133
4.6 Die physiologische Bedeutung des vom oszillierenden Muskel freigesetzten Materials - Ansatzpunkte für weiterführende Experimente	137
5. <u>Anhang</u>	140
5.1 Die quergestreifte Muskelfaser als dreidimensionales Beugungsgitter	140
5.2 Theoretische Grundlagen der statistischen Signalanalyse	144
6. <u>Zusammenfassung</u>	148
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	151

1. EINLEITUNG

Oszillierende Vorgänge sind in den Gebieten der Physik, Chemie und Biologie alltägliche Erscheinungen. Ihr Spektrum reicht von der einfachen Pendelbewegung bis zu den komplexen biologischen Uhren, die den Tages- und Jahresrhythmus vieler Organismen steuern. Rhythmisch ablaufende Veränderungen sind ein Charakteristikum zahlreicher physiologischer Prozesse, die bis auf die Organisationsstufe von Einzellern und in subzellulären Systemen nachgewiesen werden konnten (vergl. Hess & Boiteux, 1971). So entdeckten Duysens und Ames (1957), daß der Glykolyseprozeß periodisch abläuft; detaillierte kinetische Untersuchungen zeigten, daß sowohl die NADH-Produktion wie auch die Konzentration verschiedener Zwischenprodukte oszillatorischen Schwankungen unterliegt (Hess & Boiteux, 1968). Obwohl biologische Systeme zahlreiche Beispiele oszillatorischer Vorgänge darstellen, scheiterte eine systematische Analyse oft an der Komplexität solcher Phänomene.

Eine weitgehende Aufklärung einer oszillierenden Reaktion gelang in einem einfacheren, leichter überschaubaren chemischen System (s. a. Franck, 1978; Epstein, Kustin, De Kepper & Orban, 1983). Die heute nach den beiden Chemikern Belousov und Zhabotinsky benannte "BZ-Reaktion" ist die erste und bisher einzige oszillierende Reaktion, deren Mechanismus aufgeklärt wurde und durch Computersimulation bestätigt werden konnte. Sie besteht aus 18 Elementarreaktionen, an denen 21 verschiedene Reaktionspartner beteiligt sind (s. Abb. 1.1). Es handelt sich um eine durch Cer-Ionen katalysierte Decarboxylierung von Malonsäure durch Bromat in schwefelsaurer Lösung. Im Reaktionsverlauf pendelt das Cer-Ion zwischen dem farblosen dreiwertigen Ce^{3+} und dem gelben vierwertigen Zustand Ce^{4+} hin und her, so daß die Farbe der Lösung zwischen farblos und gelb wechselt. Durch Variation der Konzentrationsverhältnisse der Reaktanten lassen sich sowohl zeitliche wie auch räumliche Oszillationen beobachten.

1	$2\text{H}^+ + \text{Br}^- + \text{BrO}_3^- \rightleftharpoons \text{HOBr} + \text{HBrO}_2$
2	$\text{H}^+ + \text{HBrO}_2 + \text{Br}^- \rightleftharpoons 2\text{HOBr}$
3	$\text{HOBr} + \text{Br}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Br}_2 + \text{H}_2\text{O}$
4	$\text{CH}_2(\text{COOH})_2 \rightleftharpoons (\text{OH})_2\text{C}=\text{CHCOOH}$
5	$\text{Br}_2 + (\text{OH})_2\text{C}=\text{CHCOOH} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{Br}^- + \text{BrCH}(\text{COOH})_2$
6	$\text{HBrO}_2 + \text{BrO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2\text{BrO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
7	$\text{BrO}_2 + \text{Ce}^{3+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Ce}^{4+} + \text{HBrO}_2$
8	$\text{Ce}^{4+} + \text{BrO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{BrO}_3^- + 2\text{H}^+ + \text{Ce}^{3+}$
9	$2\text{HBrO}_2 \rightleftharpoons \text{HOBr} + \text{BrO}_3^- + \text{H}^+$
10	$\text{Ce}^{4+} + \text{CH}_2(\text{COOH})_2 \rightleftharpoons \text{CH}(\text{COOH})_2 + \text{Ce}^{3+} + \text{H}^+$
11	$\text{CH}(\text{COOH})_2 + \text{BrCH}(\text{COOH})_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Br}^- + \text{CH}_2(\text{COOH})_2 + \text{HOC}(\text{COOH})_2 + \text{H}^+$
12	$\text{Ce}^{4+} + \text{BrCH}(\text{COOH})_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Br}^- + \text{HOC}(\text{COOH})_2 + \text{Ce}^{3+} + 2\text{H}^+$
13	$2\text{HOC}(\text{COOH})_2 \rightleftharpoons \text{HOCH}(\text{COOH})_2 + \text{O}=\text{CHCOOH} + \text{CO}_2$
14	$\text{Ce}^{4+} + \text{HOCH}(\text{COOH})_2 \rightleftharpoons \text{HOC}(\text{COOH})_2 + \text{Ce}^{3+} + \text{H}^+$
15	$\text{Ce}^{4+} + \text{O}=\text{CHCOOH} \rightleftharpoons \text{O}=\text{CCOOH} + \text{Ce}^{3+} + \text{H}^+$
16	$2\text{O}=\text{CCOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{O}=\text{CHCOOH} + \text{HCCOOH} + \text{CO}_2$
17	$\text{Br}_2 + \text{HCCOOH} \rightleftharpoons 2\text{Br}^- + \text{CO}_2 + 2\text{H}^+$
18	$2\text{CH}(\text{COOH})_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_2(\text{COOH})_2 + \text{HOCH}(\text{COOH})_2$

Abb. 1.1

Die Belousov-Zhabotinsky-Reaktion

Die Reaktion führt ihren Namen nach ihrem Entdecker B. P. Belousov und nach A. M. Zhabotinsky, der sie weiterentwickelte. Sie besteht aus 18 Elementarreaktionen, an denen 21 verschiedene Reaktionspartner teilnehmen. Ausgangsprodukte sind Malonsäure ($\text{CH}_2(\text{COOH})_2$), Bromat (BrO_3^-), Bromid (Br^-) und dreiwertiges Cer (Ce^{3+}). Das schwefelsaure Medium steuert Wasserstoffionen (H^+) bei. Reaktionsprodukte sind Kohlendioxid (CO_2), Ameisensäure (HCCOOH) und Brommalonsäure ($\text{BrCH}(\text{COOH})_2$).

Die Bedeutung der Analyse chemischer Oszillationen für oszillatorische Vorgänge in der belebten Natur liegt u. a. darin, daß allgemeingültige Bedingungen ermittelt werden konnten, die entweder notwendig oder zumindest günstig für das Auftreten oszillierender Reaktionen waren:

1. Chemische Systeme sind nur dann oszillationsfähig, wenn sie hinreichend weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt ablaufen. Sie treten als zeitlich unbegrenztes Phänomen nur in thermodynamisch offenen Systemen auf.
2. Es muß eine Rückkopplung existieren, so daß ein beliebiges Produkt eines beliebigen Schrittes in der Reaktionsfolge seine eigene Bildungsgeschwindigkeit beeinflussen kann. Eine verbreitete Art der Rückkopplung in lebenden Systemen ist beispielsweise die allosterische Hemmung bzw. Aktivierung eines Enzyms (s. a. Hess & Boiteux, 1968).
3. Das System muß die Eigenschaft der "Bistabilität" aufweisen: Unter gleichen äußeren Bedingungen muß es in zwei unterschiedlichen, stabilen stationären Reaktionszuständen vorliegen können. Als stationär wird hier der Zustand eines Systems bezeichnet, wenn sich alle Variablen, auch die Konzentrationen der beteiligten Reaktanden auf konstante Werte eingependelt haben, d. h. sich im Zustand des thermodynamischen Gleichgewichts befinden. Stabil ist ein stationärer Zustand, wenn eine kleine Änderung einer Variablen das System nicht aus dem stationären Zustand herausführt.

Es bleibt die Frage offen, ob die hier aufgestellten Bedingungen hinreichend sind für das Auftreten anderer oszillatorischer Vorgänge, d. h. ob all diesen Systemen der gleiche Wirkungsmechanismus zugrunde liegt, der sich von dem chemischer Oszillationen nur durch den Grad an Komplexität unterscheidet.

Auch auf dem Gebiet der Muskel- und Membranphysiologie sind zahlreiche oszillatorische Vorgänge bekannt, deren Wirkungsmechanismen jedoch bis heute noch weitgehend ungeklärt sind. Die folgenden Kapitel der Einleitung geben eine Übersicht über oszillatorische Phänomene aus der Herz- und Skelettmuskelphy-



siologie, deren Problematik mit den in dieser Arbeit vorgestellten Koffein-induzierten Oszillationen in Skelettmuskelfasern verwandt ist. Der Schwerpunkt liegt auf der Darstellung einer Studie von Kumbaraci und Nastuk (1982), "Action of caffeine in excitation-contraction coupling of frog skeletal muscle fibres", die Ausgangsbasis für die eigenen Untersuchungen war. In diesem Zusammenhang werden die zur Zeit diskutierten Theorien zur Wirkung von Koffein auf die Skelettmuskulatur vorgestellt.

1.1 Oszillatorische Phänomene in Herzmuskelpräparaten

Weitaus intensiver als in der Skelettmuskelphysiologie wurden oszillatorische Phänomene in Herzmuskelpräparaten verschiedener Herkunft untersucht. Wird in Herzzellen die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration erhöht, sind in vielen Präparaten Oszillationen der freien zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration zu verzeichnen (Orchard, Eisner & Allen, 1983; Wier, Kort, Stern, Lakatta & Marban, 1983). Diese Oszillationen lassen sich in zwei Klassen aufteilen:

1. Ohne Reizung der Präparate treten spontane Oszillationen der freien Ca^{2+} -Ruhekonzentration mit einer Frequenz von bis zu 4 s^{-1} auf, die oft von zyklischen Schwankungen der Kraft begleitet sind.
2. Elektrische Reizung der Präparate löst ebenfalls Oszillationen der freien Ca^{2+} -Konzentration und oszillatorische "Nach-Kontraktionen" aus, die einer depolarisationsinduzierten Ca^{2+} -Freisetzung folgen. Nach Kass und Tsien (1982) resultieren diese "Nach-Kontraktionen" zumindest partiell aus einer Synchronisation spontaner Oszillationen. Die oszillatorische Aktivität wird auf eine zyklische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem bzw. Aufnahme von Ca^{2+} ins sarkoplasmatische Retikulum (SR) zurückgeführt. Der Prozeß wird im Rahmen der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung diskutiert

(Fabiato & Fabiato, 1975).

Einen entscheidenden Beitrag zu dieser Problematik stellen Arbeiten von Allen, Eisner und Orchard (1984) dar, in denen spontane im Vergleich zu elektrisch induzierten Oszillationen in Papillarmuskelzellen aus Säugerherzen untersucht wurden. Zur Messung der freien Ca^{2+} -Konzentration wurde in superfizielle Zellen des Präparates das Photoprotein Aequorin injiziert und parallel zum Aequorinsignal die Kraftentwicklung aufgezeichnet. Mit der Aequorin-Methodik gelang es erstmalig, Ca^{2+} -Fluktuationen in Herzmuskelzellen direkt zu messen. Die Fourieranalyse zeigte, daß die spontanen Oszillationen ein Frequenzmaximum zwischen 3 und 4 s^{-1} besaßen. In elektrisch stimulierten Präparaten folgte einem Ca^{2+} -Transienten, der mit einer Kontraktion assoziiert war, eine Reihe gedämpfter Ca^{2+} -Oszillationen, die von "Nach-Kontraktionen" begleitet waren. Beide Klassen von Oszillationen wiesen einige gemeinsame Charakteristika auf:

1. Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen lagen die Frequenzmaxima sowohl spontaner wie elektrisch induzierter Oszillationen in demselben Bereich.
2. Die Frequenz variierte mit der Höhe der mittleren freien Ca^{2+} -Konzentration: Eine Erhöhung induzierte eine Zunahme der Frequenz in beiden Oszillationstypen.
3. Nach Zugabe von Pharmaka, welche die Ca^{2+} -Aufnahme ins bzw. Freisetzung aus dem SR reduzieren (Koffein und Ryanodin), war keine oszillatorische Aktivität mehr zu verzeichnen. Ca^{2+} -Antagonisten (z. B. D-600), die den Einwärtsstrom von Calciumionen über das Sarkolemma hemmen, blieben hingegen wirkungslos.

Die Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse aus Kraft- und Potentialmessungen, nach denen die nach Stimulierung des Präparates auftretenden "Nach-Kontraktionen" aus einer Synchronisation spontaner Oszillationen hervorgehen. Aufgrund der pharmakologischen Hemmung der oszillatorischen Aktivität durch Koffein und Ryanodin werden beide Phänomene daher wahrscheinlich durch eine zyklische Aktivität des sarkoplasmatischen Re-

tikulums verursacht. Nach einer Modellvorstellung von Allen et al. (1984) für eine oszillatorische Ca^{2+} -Freisetzung wird eine erneute Freisetzung stets dann initiiert, wenn der Ladungszustand des SR's einen "kritischen" Wert überschritten hat. Diese These wird durch den Befund unterstützt, daß die Frequenz der Oszillationen bei einer Erhöhung der mittleren freien Ca^{2+} -Konzentration der Extrazellulärlösung zunimmt.

Fabiato und Mitarbeiter (1975, 1978a, 1985a) untersuchten ähnliche oszillatorische Vorgänge an enthäuteten Herzmuskelzellen aus dem Ventrikel von Säugerherzen. Der Vorteil dieser Präparate liegt darin, daß sie eine weitgehende Veränderung des intrazellulären Milieus und eine gezielte Beeinflussung intrazellulärer Strukturen erlauben. Für die Enthäutung der Herzmuskelzellen entwickelten sie - analog zur Enthäutung von Skelettmuskelfasern (Natori, 1954) - ein mechanisches Verfahren, bei dem das Sarkolemma durch Homogenisation der Zellen zerstört wird und verbleibende Reste in einer Mikrosezierung vorsichtig entfernt werden (vergl. Fabiato & Fabiato, 1976).

In Lösungssystemen, die nur eine schwache Pufferkapazität für freies Ca^{2+} besaßen ($\text{EGTA}_{\text{total}} = 50 \mu\text{M}$), traten spontane zyklische Kontraktionen auf, welche die Autoren auf eine oszillatorische Aktivität des SR's zurückführten. Zwei Befunde machten eine Beteiligung anderer intrazellulärer Strukturen unwahrscheinlich: Die Oszillationen traten bei höheren EGTA-Konzentrationen bzw. nach Zerstörung der SR-Membranen nicht mehr auf, so daß eine zyklische Aktivität der Myofilamente ausgeschlossen werden konnte. Da weder die Zugabe von Azid noch von Ruthenium Rot - Hemmstoffe der energieabhängigen Ca^{2+} -Aufnahme über die Mitochondrienmembran bzw. der Ca^{2+} -Freisetzung aus den Mitochondrien - die oszillatorische Kraftentwicklung beeinflussen, war außerdem ausgeschlossen, daß die Mitochondrien, die einen weiteren intrazellulären Ca^{2+} -Speicher darstellen, eine Rolle in diesem Prozeß spielten.

Zyklische Kontraktionen wurden ebenfalls durch eine geringe Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration von $10^{-7,7}$ auf $10^{-7,4}$ M ausgelöst. Da die freie Ca^{2+} -Konzentration von $10^{-7,4}$ M zu ge-

ring ist, um die Myofilamente direkt zu aktivieren, werden auch diese Oszillationen wahrscheinlich durch eine zyklische Aufnahme und Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR verursacht, die über eine regenerative Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung erklärbar wäre. Die Amplitude der Oszillationen nahm mit einer Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung zu. Diese graduierte Kraftentwicklung ist jedoch nicht mit einem einfachen regenerativen Freisetzungsprozeß vereinbar (s. a. Costantin & Taylor, 1973). In diesem Fall wäre eine Alles-oder-Nichts-Reaktion zu erwarten, d. h. ein effektiver Ca^{2+} -Stimulus sollte immer eine gleichbleibende Ca^{2+} -Freisetzung und damit eine gleichbleibende Kraftentwicklung verursachen. Zusätzliche Mechanismen, wie eine Veränderung der ADP- oder freien Mg^{2+} -Konzentration, nehmen daher wahrscheinlich eine modulierende Funktion ein.

Die enthäuteten Herzmuskelzellen erwiesen sich als ein geeignetes Präparat, einen zweiten Typus von Oszillationen zu studieren, der von den Myofilamenten selbst gesteuert wird (Fabiato & Fabiato, 1978b). Im Gegensatz zu den SR-regulierten Spannungsozillationen sind sie nur bei einer partiellen, submaximalen Ca^{2+} -Aktivierung der Zellen zu registrieren. Im wesentlichen lassen sie sich durch zwei Merkmale beschreiben:

1. Die oszillatorische Bewegung setzt sich aus einer Folge zyklischer Kontraktionen mit einer schnellen Relaxationsphase und einer 10- bis 20mal langsameren Anstiegsphase zusammen.
2. Sie treten nur in Lösungen mit einer freien Ca^{2+} -Konzentration zwischen $10^{-6,5}$ und $10^{-5,7}$ M auf, d. h. bei einer partiellen Aktivierung der Myofilamente.

Die Oszillationen dauerten in der Regel über einen Zeitraum von mehr als 20 Minuten an. In einigen Fällen setzten sie spontan nach einer vorangegangenen Abnahme von Frequenz und Amplitude aus. Diese spontane Unterbrechung trat immer dann auf, wenn während der oszillatorischen Bewegung das maximal entwickelbare Kraftniveau erreicht wurde. Nach Interpretation von Fabiato und Fabiato (1978b) sind oszillatorische Vorgänge

daher nicht bei Erreichen der maximalen isometrischen Kraft beteiligt. Da die Oszillationen selbst bei einer hohen Ca^{2+} -Pufferung des Systems oder bei einer funktionellen Hemmung bzw. Zerstörung des sarkoplasmatischen Retikulums induziert werden konnten, ist eine zyklische Aktivität des SR's auszuschließen. Ebenso wie die SR-gesteuerten Oszillationen werden sie nicht durch eine oszillatorische Aktivität der Mitochondrien verursacht, da Pharmaka, die den Transport von Ca^{2+} über die Mitochondrienmembran hemmen, wirkungslos blieben.

Nach einem Modell von Fabiato und Fabiato (1978b) lassen sich diese myofilamentären Spannungsoszillationen auf eine streckungsinduzierte Zunahme der Ca^{2+} -Sensitivität einzelner Sarkomere zurückführen. Während der Aktivierung der Herzmuskelzellen verlieren einzelne Sarkomere ihre Spannung, da sie entweder inaktiviert oder durch benachbarte Sarkomere abrupt gestreckt werden. Ausgelöst durch eine Streckung angrenzender Sarkomere und einer damit verbundenen Erhöhung ihrer Ca^{2+} -Sensitivität können sie jedoch erneut Spannung entwickeln.

1.2 Oszillatorische Vorgänge in isolierten Skelettmuskelfasern

Wellenartige kontraktile Bewegungen wurden schon früh von Natori (1965) in enthäuteten Skelettmuskelfasern entdeckt. Werden enthäutete Muskelpräparate in Paraffinöl mit Strompulsen geringer Amplitude elektrisch gereizt, so sind langsam fortschreitende Kontraktionen mit einer Ausbreitungsgeschwindigkeit von 50 - 200 $\mu\text{m/s}$ zu beobachten. Nach einer Vorinkubation der intakten Muskelfasern in einer depolarisierenden Lösung treten diese elektrisch induzierten Kontraktionen in der enthäuteten Faser nicht mehr auf. Dies spricht für eine Depolarisation der Membranen des transversalen T-Systems als Ursache für diese wellenartige Bewegung (Peachey & Eisenberg, 1978).

Die Arbeitsgruppen Ebashi, Endo und Ohtsuki (1969), Endo, Tanaka und Ogawa (1970) sowie Ford und Podolsky (1972) untersuchten das Auftreten oszillatorischer Krafttransienten in enthäuteten Skelettmuskelfasern von Amphibien unter dem Aspekt der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Sie werden wahrscheinlich analog zu oszillatorischen Ca^{2+} -Fluktuationen in Herzmuskelzellen durch eine zyklische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR der Muskelfaser verursacht. Die Zugabe von Koffein in Konzentrationen $\geq 0,2$ mM bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration von 5×10^{-7} M induzierte repetitive Kontraktionen, deren Frequenz von der eingesetzten Koffeinkonzentration abhing. Bei einer Konzentration von 5 mM Koffein war ein Niveau erreicht, bei dem sich keine einzelnen, voneinander getrennten Krafttransienten mehr aufzeichnen ließen, sondern nur noch kleine oszillatorische Bewegungen der relaxierenden Phase des Krafttransienten aufgesetzt waren. Die Amplitude der zyklischen Kontraktionen betrug ca. 80 % der maximal entwickelten Kraft, so daß vom größten Teil des SR's offensichtlich synchron Ca^{2+} freigesetzt wurde. Wurde die freie Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung auf 10^{-6} M erhöht, traten auch ohne Koffein spontane oszillatorische Kontraktionen auf. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, daß die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR dem Alles-oder-Nichts-Gesetz folgte und damit einen regenerativen Prozeß darstellte. Endo und Mitarbeiter (1970) konnten ebenso zeigen, daß Calciumionen allein in Konzentrationen, die unterhalb der Schwelle für eine direkte Aktivierung der Myofilamente lagen, eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR induzierten. Aus dieser und weiterführenden Arbeiten entwickelte sich die Theorie der " Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung". Obwohl auch weitere Untersuchungen bestätigten, daß unter bestimmten Voraussetzungen das SR den Bedingungen einer Ca^{2+} -generierten Ca^{2+} -Freisetzung genügt (Stephenson, 1981a), wird deren physiologische Bedeutung heute dagegen kontrovers diskutiert (vergl. Endo, 1977).

Spannungsoszillationen, die nicht mit Ionenbewegungen über intrazelluläre Membrankompartimente assoziiert waren, wurden von

Stephenson und Williams (1981, 1982) in enthäuteten, langsamen Zuckungsfasern des Säugerskelettmuskels gemessen. Sie traten bei einer partiellen Ca^{2+} -Aktivierung und in einem bestimmten Sarkomerlängenbereich zwischen 2,3 und 3,1 μm auf. Zwei Klassen von Oszillationen ließen sich unterscheiden: eine gedämpfte Schwingung mit relativ großer Amplitude und niedriger Frequenz und eine augenscheinlich ungedämpfte Schwingung mit kleinerer Amplitude und höherer Frequenz, welche die gedämpfte überlagerte. Die Amplitude der gedämpften Schwingung nahm verstärkt zu, wenn die Sarkomerlänge von 2,5 auf 2,9 μm erhöht wurde, während eine Streckung der Präparate auf Sarkomerlängen von $\geq 3,1 \mu\text{m}$ die oszillatorische Aktivität hemmte. Mikroskopische Beobachtungen zeigten, daß die Kraftoszillationen stets mit oszillatorischen Bewegungen kleiner Sarkomergruppen innerhalb der Muskelfaser assoziiert waren.

Iwazumi und Pollack (1981) beschrieben ähnliche Kraft- und Sarkomerlängenoszillationen in einem verwandten Muskelpräparat. Während einer langsamen Aktivierung beobachteten sie sinusartige Oszillationen mit einer Frequenz zwischen 7,5 und 12 s^{-1} , wobei sich die einzelnen Sarkomerlängen um maximal 0,3 μm änderten.

Neuere Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe Stephenson und Mitarbeiter ergaben, daß die Oszillationen myofilamentären Ursprungs stark von der Ionenstärke abhängen (Fink, Stephenson & Williams, 1986). In langsamen Zuckungsfasern nehmen sowohl Amplitude als auch Frequenz der Oszillationen mit abnehmender Ionenstärke zu, dagegen werden sie durch hohe Ionenstärken ($> 254 \text{ mM}$) nahezu vollständig gehemmt. In einem Großteil von schnellen Zuckungsfasern treten bei niedrigen Ionenstärken und submaximaler Aktivierung ebenfalls derartige Kraftoszillationen auf, die sich jedoch hinsichtlich Frequenz und weiterer Parameter von denen langsamer Fasern unterscheiden.

Da die beschriebenen Phänomene in Skelettmuskelfasern und Herzzellen in vielen Punkten sehr ähnlich, wenn auch nicht identisch, ablaufen, schließen sich die Autoren der Interpretation von Fabiato und Fabiato (1978b) an, nach der die oszillatorische Aktivität durch eine streckungsinduzierte Zu- und

Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität einzelner Sarkomere oder ganzer Sarkomergruppen verursacht wird.

Im Gegensatz zur enthäuteten Muskelfaser finden oszillatorische Vorgänge in intakten Skelettmuskelfasern nur in wenigen Arbeiten Erwähnung. Armstrong, Huxley und Julian (1966) beschrieben kleine oszillatorische Längen- und Spannungsänderungen während einer tetanischen Stimulierung der Präparate, die vom Ladungszustand des sarkoplasmatischen Retikulums abhingen. Koffein-induzierte Kontrakturen sind ebenfalls oft von oszillatorischen Schwankungen der Kraft begleitet, die der Relaxationsphase des Krafttransienten aufgesetzt sind (Lüttgau & Oetliker, 1968). Erste systematische Untersuchungen zur Analyse oszillatorischer Vorgänge in intakten Skelettmuskelfasern führten Nastuk und Mitarbeiter (Kumbaraci & Nastuk, 1982; Marco & Nastuk, 1968) durch. Die Arbeiten gaben Anregungen zu weiterführenden Untersuchungen und dienten als Ausgangsbasis für die eigenen Experimente.

Die Experimente wurden bei Raumtemperatur an ganzen Muskelpräparaten des *M. sartorius* des amerikanischen Grasfrosches (*Rana pipiens* L.) durchgeführt. In Gegenwart von 1 mM Koffein waren kleine, asynchrone Bewegungen einzelner Sarkomere zu beobachten, die unabhängig voneinander aufzutreten schienen. Mit zunehmender Inkubationszeit erfolgte eine allmähliche Synchronisation dieser Sarkomeroszillationen, die sich letztendlich zu fortgeleiteten wellenartigen Bewegungen entwickelten, welche sich entlang der Faserachse ausbreiteten. Charakteristisch für das Auftreten der Oszillationen war eine Latenzzeit von 20 bis 30 Minuten von der Zugabe des Koffeins zur Badlösung bis zum Einsetzen der oszillatorischen Aktivität. Die Sarkomerlängenverteilung oszillierender Präparate erfaßte einen relativ weiten Bereich von 1,7 bis 3,5 μm , wobei das Maximum bei 2,6 μm lag. Dieses war im Vergleich zu inaktiven Präparaten um 0,2 bis 0,3 μm zu kleineren Sarkomerlängen verschoben. Die Autoren konnten zeigen, daß die Oszillationen im Bereich der kontraktilen Schwelle potentialabhängig auftraten. In Koffein-behandelten Präparaten depolarisierten sie einzelne Fasern, die

trotz der allgemein oszillationsauslösenden Koffeinkonzentration nicht oszillierten, auf Potentialwerte zwischen -70 und -60 mV. Die Depolarisation löste innerhalb weniger Minuten auch in diesen Fasern wiederum Sarkomeroszillationen aus, die durch Hyperpolarisation wieder blockiert oder deren Frequenzen erniedrigt werden konnten. In völlig depolarisierten, mechanisch "refraktären" Fasern nahm die Sensitivität für Koffein ab. Es ließen sich zwar auch in depolarisierten Fasern Oszillationen induzieren, dazu mußte jedoch die Koffeinkonzentration um den Faktor 1,7 bis 2 erhöht werden. Kumbaraci und Nastuk (1982) interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, daß die Sarkomeroszillationen einen Schritt innerhalb des elektromechanischen Kopplungsprozesses einnehmen, der an der Schwelle zur Aktivierung liegt.

Das Phänomen der Sarkomeroszillationen war unter dem weiteren Aspekt interessant, daß vom oszillierenden Muskel ein niedermolekulares Material freigesetzt wird, welches seinerseits die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung verstärkt. Wurde die Badlösung oszillierender Muskeln auf ein neues Präparat appliziert, waren auch in diesem Muskel nach kurzer Latenzzeit Sarkomeroszillationen zu beobachten. Da die Latenzzeit signifikant von 30 auf 5 Minuten reduziert war, wird die oszillatorische Aktivität wahrscheinlich nicht durch das Einwirken von Koffein verursacht, sondern durch einen in der Badlösung von oszillierenden Präparaten zusätzlich enthaltenen Faktor. Die Anwesenheit von Koffein spielte in weiteren Aktivitätsmessungen jedoch eine entscheidende Rolle. Wurde das vom Muskel freigesetzte Material über eine Gelfiltration vom Koffein abgetrennt, zeigte es keinerlei Aktivität in nicht Koffein-behandelten Präparaten. Wurde dasselbe Material Koffein-haltigen Lösungen zugesetzt, waren - wiederum mit stark reduzierter Latenzzeit - Sarkomeroszillationen zu registrieren. Aufgrund von Dialyse-Experimenten und aus Ergebnissen der gelchromatographischen Aufreinigung schätzten Kumbaraci und Nastuk (1982) das Molekulargewicht auf 700 - 1000 g/mol; spektralphotometrische Messungen ergaben ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 245 nm. Die physiologische Relevanz dieses Materials ist

noch weitgehend ungeklärt. Die Autoren der Studie gehen davon aus, daß es sich um eine natürliche, im Skelettmuskel vorkommende Substanz handelt, die eine physiologische Rolle in der Aktivierung der Muskelfaser im Bereich der Kopplungsstruktur zwischen den Membranen des T-Systems und den Terminalzisternen des SR's spielt.

Aktivierungskurven, welche die Abhängigkeit der Kraftentwicklung vom Membranpotential beschreiben, folgen einem sigmoiden Kurvenverlauf, der im Bereich der kontraktiven Schwelle eine extreme Steilheit aufweist (vergl. Caputo, Gottschalk & Lüttgau, 1981; Hodgkin & Horowicz, 1960; Lüttgau & Spiecker, 1979). Hodgkin und Horowicz (1960) vermuteten in diesem Potentialbereich einen unterschwelligen Prozeß, welcher der Aktivierung der Muskelfaser unmittelbar vorausgeht. Die von Kumbaraci und Nastuk beobachteten Sarkomeroszillationen stellen möglicherweise einen derartigen Schritt in der potentialabhängigen Aktivierung dar, der durch Koffein simuliert werden kann.

Für die physiologische Ca^{2+} -Freisetzung in der Skelettmuskelfaser scheinen nach dem heutigen Kenntnisstand zwei Mechanismen essentiell zu sein: die regenerative oder Ca^{2+} -induzierte und die depolarisationsinduzierte Ca^{2+} -Freisetzung (vergl. Endo, 1977). Koffein gehört zu den Substanzen, die insbesondere bei Untersuchungen der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung von Bedeutung waren. Erste Untersuchungen über die Wirkung der Substanz auf den Skelettmuskel faßte Sandow (1965) zusammen. Das Molekül diffundiert rasch durch die Zellmembran (Bianchi, 1962) und setzt Calciumionen aus dem SR frei (Weber, 1968; Weber & Herz, 1968). Die resultierende Kraftentwicklung erfolgt in intakten und enthäuteten Fasern etwa gleich schnell (Lüttgau & Oetliker, 1968; Miller & Thieleczek, 1977). Der Wirkungsmechanismus des Moleküls wird heute kontrovers diskutiert: Als Wirkorte stehen sowohl die T-tubulären Membranen, die Kopplungsstruktur zwischen T-System und sarkoplasmatischem Retikulum als auch die Membranen des SR's selbst zur Diskus-

sion (s. Abb. 1.2). Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die zur Zeit vertretenen Theorien zur Wirkung von Koffein auf die Skelettmuskulatur, wobei der Schwerpunkt auf der Beschreibung von Effekten niedriger, nicht kontrakturauslösender Konzentrationen liegt.

1.3 Die Wirkung von Koffein auf die Skelettmuskulatur

Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von Koffein ist seit langem bekannt: Der letzte Schritt der durch Koffein induzierten Wirkungskette ist, wie von Weber (1968) und Weber und Herz (1968) gezeigt werden konnte, ein Ansteigen der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration. Koffein verändert in niedrigen Konzentrationen weder die elektrischen Membraneigenschaften (Axelsson & Thesleff, 1958) noch wird das Akto-Myosin-System auf direktem Wege beeinflusst (Hasselbach, 1953; Korey, 1950; Moss, 1979). Die von Wendt und Stephenson (1983) beobachtete Sensitivierung der Myofilamente trat nur bei sehr hohen Koffeinkonzentrationen (≥ 20 mM) auf. Hinreichend hohe Koffeinkonzentrationen lösen ohne eine Depolarisation der Zellmembran Kontraktionen aus, so daß als potentielle Wirkorte des Moleküls nur die Membranen des T-Systems und des SR's offen bleiben.

Erste Hinweise für einen T-tubulären Wirkort von Koffein gaben Untersuchungen von Lüttgau und Oetliker (1968) über die Wirkung des Moleküls auf den kontraktilen Mechanismus isolierter, intakter Skelettmuskelfasern. Niedrige Koffeinkonzentrationen (1 - 2 mM) verstärkten lediglich die Amplitude elektrisch induzierter Kontraktionen, während höhere Konzentrationen (5 - 10 mM) Kontraktionen auslösten, die die Höhe maximaler Kaliumkontraktionen erreichten. Amplitude und Zeitverlauf der Kontraktionen hingen vom eingestellten Membranpotential ab. Die Aktivierungskurve (Abhängigkeit der Kontraktionsamplitude vom Membranpotential) wurde in Gegenwart niedriger Koffeinkonzen-

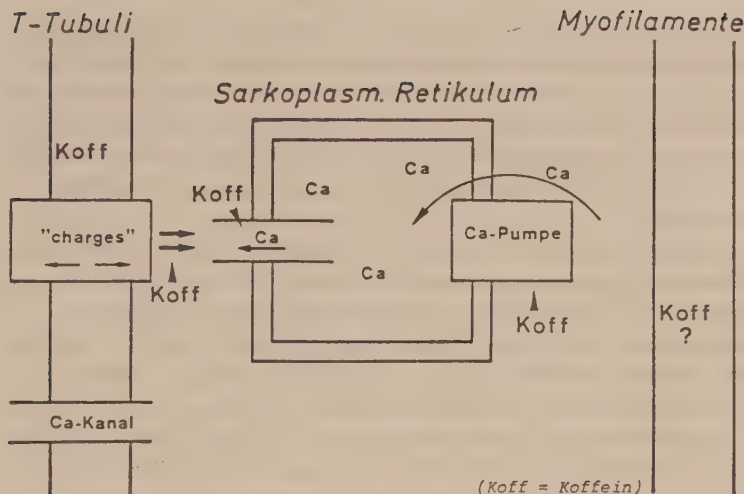


Abb. 1.2

Potentielle Wirkorte von Koffein in der Skelettmuskelfaser

Die Kette von Ereignissen, die zu einer Aktivierung der Muskelfaser führt, wird unter dem Begriff der "elektro-mechanischen Kopplung" zusammengefaßt. Die Aktivierung der Muskelfaser beginnt, ausgelöst durch ein Nervenaktionspotential, im Bereich der motorischen Endplatte mit einer lokalen Depolarisation, die als fortgeleitetes Aktionspotential auf die gesamte Fasermembran übertragen wird. Das mit der äußeren Zellmembran kommunizierende T-System leitet die Depolarisation regenerativ ins Zellinnere fort. Sie führt zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus den Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), das in diesem Bereich in engem Kontakt zum T-System steht. Es erfolgt ein Anstieg der freien zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-8} auf 10^{-5} - 10^{-4} M. - Der Schritt der Übertragung des elektrischen Signals von den Membranen des T-Systems auf die Terminalzisternen des SR's ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird eine Beteiligung geladener Moleküle ("charges") in der T-tubulären Membran diskutiert, deren depolarisationsabhängige Aktivierung über eine hypothetische Kopplungsstruktur zu einer Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in der SR-Membran führt (Chandler et al., 1976). - Die Bindung des freigesetzten Ca^{2+} an das Regulatorprotein Troponin induziert eine Aktivierung des Querbrückenzyklus, die zu einer Gleitbewegung der Myofilamente und somit zu einer Kontraktion der Muskelfaser führt. Die Reabsorption des freigesetzten Ca^{2+} über eine Ca^{2+} -Transport-ATPase (Ca^{2+} -Pumpe) ins SR reduziert die interfilamentäre Ca^{2+} -Konzentration; es erfolgt eine Dissoziation von Ca^{2+} von den Myofilamenten und damit eine Erschlaffung der Muskelfaser.

Das Methylxanthin Koffein vermag schon in geringen Konzentrationen (≤ 2 mM) verschiedene Schritte des oben beschriebenen Aktivierungszyklus zu beeinflussen: Als Wirkorte stehen a) das T-tubuläre System, b) der Kopplungsschritt zwischen T-System und SR-Membran, c) der Ca^{2+} -Kanal des SR's und d) die Ca^{2+} -Transport-ATPase des SR's zur Diskussion. Eine Bindung von Koffein an die unter den Punkten a - c aufgeführten Strukturen fördert die Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle in der SR-Membran, während das Molekül hemmend auf die Reabsorption von Ca^{2+} ins SR (Punkt d) wirkt. Ein Effekt auf die Myofilamente ist nur bei hohen Konzentrationen (≥ 20 mM) zu verzeichnen.

trationen zu negativeren Potentialen, die Inaktivierungskurve (Abhängigkeit der Kontraktionskraft von einem konditionierenden Vorpuls) zu positiveren Potentialen verschoben, so daß die Aktivierung durch Koffein gefördert und der Inaktivierungsprozess gehemmt wurde. Die Ergebnisse konnten im "voltage clamp"-Experiment von der Arbeitsgruppe Caputo et al. (1981) bestätigt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung des Inaktivierungsprozesses bieten Experimente zur Wiederherstellung der Kontraktionskraft nach einer vorausgehenden Inaktivierung ("restoration"- oder "repriming"-Experimente). Caputo et al. (1981) zeigten, daß auch der "repriming"-Prozeß in Gegenwart von Koffein (0,5 mM) beschleunigt wird.

Die strenge Potentialabhängigkeit des Koffeineffektes in intakten Skelettmuskelfasern führten die Arbeitsgruppen auf eine Bindung des Moleküls innerhalb der T-tubulären Membranen (Lüttgau & Oetliker, 1968) bzw. an eine hypothetische Kopplungsstruktur zwischen T-System und SR-Membranen (Caputo et al., 1981) zurück.

Weitgehend unverstanden ist bisher der Teilschritt der elektro-mechanischen Kopplung, der die Übertragung des elektrischen Signals von der T-Tubulus-Membran auf die SR-Membranen vermittelt (T-SR-Kopplung). Die meisten Anhaltspunkte bietet zur Zeit ein Modell von Schneider und Chandler (1973), in dem eine Beteiligung geladener Moleküle in der T-System-Membran diskutiert wird: Eine Depolarisation der T-Tubulus-Membran verursacht eine intramembranale Bewegung dieser Ladungsträger ("charge movements"), als deren Folge über eine hypothetische Kopplungsstruktur ("rigid rods") Ca^{2+} -Kanäle in der SR-Membran geöffnet werden (Chandler, Rakowski & Schneider, 1976). Kovacs und Szücs (1983) untersuchten den Einfluß unterschwelliger Koffeinkonzentrationen auf die intramembranaln Ladungsbewegungen und verglichen diese mit der Wirkung auf die resultierenden Ca^{2+} -Transienten. Koffein potenzierte in einer Konzentration von 0,5 mM die Kontraktionskraft, wobei gleichzeitig die Amplitude des Ca^{2+} -Transienten erhöht war. Das Molekül

hatte dagegen keinen Einfluß auf den "charge movement"-Prozeß: Es war weder die Potentialabhängigkeit noch die Kinetik der Ladungsbewegungen bei einem gegebenen Membranpotential verändert. Dagegen nahm die minimale Menge der Ladungen (Schwellenladung), die zur Auslösung einer gerade sichtbaren Kontraktion verschoben werden muß, um 1/5 ab. Das Ergebnis machte deutlich, daß der Wirkort von Koffein entweder an der SR-Membran selbst oder an der Verbindung zwischen T-Tubuli und den Terminalzisternen des SR's lokalisiert ist. Die Potenzierung der Zuckungskraft führten die Autoren auf eine erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR zurück. Die erniedrigte Schwellenladung (s. o.) zeigt eine Sensitivierung der SR-Membranen gegenüber den Ladungsbewegungen in die aktivierende Position an. Eine Abnahme der Ca^{2+} -Aufnahmerate, wie sie von Weber (1968) an isolierten SR-Vesikel gemessen wurde, war in Gegenwart niedriger Koffeinkonzentrationen nicht zu verzeichnen.

Weitere Messungen mit Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen (Delay, Ribalet & Vergara, 1986) zeigten, daß auch die potentialabhängige Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR zu negativeren Potentialen verschoben wird, d. h. in Gegenwart von Koffein gefördert wird. Da die Autoren ebenfalls keine Veränderung der elektrischen Eigenschaften der tubulären Membran nachweisen konnten, stimmen sie der Hypothese von Kovacs und Szücs (1983) zu, daß Koffein den Kopplungsschritt zwischen T-tubulärer und SR-Membran beeinflusst. Sie postulieren in diesem Zusammenhang einen intermediären, regulatorischen Schritt - evtl. über ein "second messenger"-System -, wobei sie jedoch eine direkte Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR nicht ausschließen.

Belege für eine direkte Wirkung von Koffein auf die SR-Membranen ergaben sich insbesondere aus Untersuchungen an enthäuteten Skelettmuskelfasern und biochemischen Experimenten mit fragmentierten SR-Membranen. Die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung von Koffein auf das SR wurde bereits 1968 von Weber und Herz und 1970 von Ogawa nachgewiesen. Endo (1975) führte den Koffeineffekt auf eine Potenzierung des Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus'

zurück: Mit zunehmender Koffeinkonzentration war eine geringere freie Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung zur Ca^{2+} -induzierten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR enthäuteter Fasern notwendig, während die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR unbeeinflusst blieb. Das Ergebnis weist darauf hin, daß Koffein wahrscheinlich in den Mechanismus der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung eingreift, da in Gegenwart der Substanz schon Ca^{2+} -Konzentrationen der Badlösung, die unterhalb der Schwellenkonzentrationen für einen Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Stimulus lagen, einen effektiven Ca^{2+} -Efflux aus dem SR verursachten. Die Wirkung von Koffein ist in vieler Hinsicht der einer erniedrigten freien Mg^{2+} -Konzentration ähnlich (Endo, 1975). Spätere Untersuchungen in Gegenwart niedriger Mg^{2+} -Konzentrationen (Stephenson, 1981b) zeigten im Gegensatz zu Endo (1975), daß Koffein auch eine von der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung unabhängige Wirkung auf das SR ausübt: Koffein initiiert Ca^{2+} -unabhängig einen geringen Ca^{2+} -Efflux aus dem SR, welcher durch den Ca^{2+} -abhängigen Freisetzungsmechanismus verstärkt werden kann. Gleichzeitig war eine Hemmung des aktiven Transportes von Ca^{2+} ins SR zu verzeichnen. Stephenson (1981b) impliziert in einem Modell einen gemeinsamen Calciumkanal in der SR-Membran für den Koffein- und Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -„release“, dessen Öffnung und Schließung durch zwei Rezeptoren reguliert wird: einen Ca^{2+} - und einen Koffein-Rezeptor. Die Aktivierung des Koffein-Rezeptors erhöht die Ca^{2+} -Permeabilität des Kanals. Als Folge dessen wird der Ca^{2+} -Rezeptor aktiviert, der letztendlich die Öffnung des Kanals reguliert. In Gegenwart hoher Ca^{2+} -Konzentrationen steuert allein der Ca^{2+} -Rezeptor die Kanalaktivität. In vielen Experimenten ging die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung gleichzeitig mit einer Hemmung der Ca^{2+} -Aufnahme ins SR einher (s. Ohnishi, 1979; Sorenson, Coelho & Reuben, 1986). Die beiden Phänomene sind in vielen Punkten sehr ähnlich - z. B. bzgl. der Ca^{2+} -Empfindlichkeit oder der Abhängigkeit von der freien ATP-Konzentration - , so daß von verschiedenen Autoren ein gemeinsamer Wirkungsmechanismus für beide Vorgänge angenommen wird (Sorenson et al., 1986). Obwohl in einigen Laboratorien die Hemmung der ATPase-Aktivität nicht bestätigt

werden konnte (s. Ungeheuer, Migala & Hasselbach, 1986), wird eine indirekte Wirkung des Pumpproteins für den Koffein-induzierten Efflux nicht ausgeschlossen. Sorenson et al. (1986) weisen nachdrücklich darauf hin, daß die hemmende Wirkung niedriger Koffeinkonzentrationen auf die Ca^{2+} -Pumpe des SR's erst in ausgeprägter Form bei einer erhöhten freien Ca^{2+} -Konzentration auftritt. Vergleichende Untersuchungen an isolierten SR-Vesikeln und enthäuteten Muskelfaserpräparaten unterstützen diesen Befund (Kirino & Shimizu, 1982).

Hinweise für eine direkte Wirkung von Koffein auf die SR-Membranen ergeben sich auch aus einer neuen Studie von Konishi und Kurihara (1987) über die Wirkung des Moleküls auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in isolierten, intakten Skelettmuskelfasern. Die freie Ca^{2+} -Konzentration wurde mit dem Ca^{2+} -sensitiven Photoprotein Aequorin gemessen. In Gegenwart von Koffeinkonzentrationen zwischen 0,6 und 1,5 mM war ohne eine meßbare Änderung der Kraftentwicklung eine Dosis-abhängige Erhöhung der Ca^{2+} -Ruhekonzentration der Muskelfaser zu beobachten, welche durch Procain und Adenin - Hemmstoffe der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung sowohl in enthäuteten (Thorens & Endo, 1975) wie in intakten Skelettmuskelfasern (Konishi, Kurihara & Sakai, 1985) - unterdrückt werden konnte. In demselben Konzentrationsbereich war ebenfalls eine Zunahme der Amplitude depolarisationsinduzierter Kontraktionen zu registrieren. Konishi und Kurihara (1987) versuchten eine Verbindung zwischen diesen beiden Befunden herzustellen: Sie gehen davon aus, daß Koffein in niedrigen Konzentrationen zunächst direkt aus dem SR Ca^{2+} freisetzt. Dieser Ca^{2+} -Efflux führt zu einem Ansteigen der zytoplasmatischen freien Ca^{2+} -Konzentration. Die erhöhte Ca^{2+} -Ruhekonzentration verursacht vermutlich die Zunahme der Kontraktionsamplitude bei einer depolarisationsinduzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Die Autoren schließen nicht aus, daß sehr niedrige Koffeinkonzentrationen ($\leq 0,2$ mM), bei denen die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration nur unwesentlich erhöht ist, eine direkte Wirkung auf die Kopplungsstruktur zwischen T-tubulären und SR-Membranen oder auf das T-System selbst ausüben.

Die Abb. 1.2 zeigt zusammenfassend die möglichen Wirkorte von Koffein in der Skelettmuskelfaser. Die neueren Untersuchungen machen deutlich, daß die Substanz in einen Schritt der elektro-mechanischen Kopplung eingreift, welcher der Depolarisation der T-Tubulusemembran und dem "charge movement"-Prozeß folgt. Ungeklärt ist jedoch weiterhin, wie man sich den molekularen Mechanismus der Koffeinwirkung vorzustellen hat.

1.4 Ausblick auf die vorliegende Arbeit

Unter dem Begriff der elektro-mechanischen Kopplung lassen sich die an der Fasermembran ablaufenden Erregungsprozesse und die Übertragung des elektrischen Signals vom T-System auf die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums, des intrazellulären Calciumspeichers, zusammenfassen (s. a. Abb. 1.2). Die von Kumbaraci und Nastuk (1982) beschriebenen Koffein-induzierten Sarkomeroszillationen repräsentieren einen Teilschritt in dieser Kette nacheinander ablaufender Prozesse, welcher an der Schwelle zur Aktivierung der Muskelfaser liegt. An diesem Vorgang scheint ein vom oszillierenden Muskel freigesetztes Material beteiligt zu sein, dem möglicherweise eine physiologische Bedeutung innerhalb des Aktivierungsprozesses zukommt.

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit war die bereits zitierte Studie von Kumbaraci und Nastuk (1982). Es wurden periodische Vorgänge in Form unterschwelliger Sarkomer- und überschwelliger Kraftoszillationen sowohl in intakten wie in enthäuteten Skelettmuskelfasern des Frosches untersucht. In diesem Zusammenhang wurde ein endogener Faktor isoliert und weitgehend aufgereinigt, der seinerseits die oszillatorische Aktivität verstärkt. Im einzelnen lassen sich die Versuche unter folgenden Gesichtspunkten zusammenfassen:

1. Messung unterschwelliger Sarkomeroszillationen in intakten Muskelfasern
 - 1.1 Aufbau eines optischen Meßverfahrens zur Registrierung und anschließende rechnergestützte Analyse der Sarkomeroszillationen
 - 1.2 Charakterisierung der Oszillationen anhand verschiedener Parameter (Temperatur, Sarkomerlänge etc.)
 - 1.3 Experimente zur Abhängigkeit der Sarkomeroszillationen vom Membranpotential und zur pharmakologischen Beeinflussung des Kopplungsschrittes
2. Vergleich von Sarkomer- und Kraftoszillationen in enthäuteten Muskelfasern
 - 2.1 Abhängigkeit der Oszillationen von der Koffein- und freien Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung
 - 2.2 Untersuchungen zur Beteiligung intrazellulärer Strukturen an der oszillatorischen Aktivität
3. Isolierung und Aufreinigung eines vom oszillierenden Muskel freigesetzten Materials
 - 3.1 Gewinnung des Materials aus oszillierenden Muskelpräparaten
 - 3.2 Biochemische Aufreinigung und Analyse des Materials
 - 3.3 Untersuchungen zur Aktivität des gereinigten Materials am Skelettmuskel

Die Ergebnisse weisen auf einen intrazellulär gesteuerten Mechanismus hin, der im Rahmen des Prozesses der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung zu diskutieren ist. Es konnte gezeigt werden, daß ein endogener Faktor, welcher vom oszillierenden Muskel freigesetzt wird, eine modulierende Wirkung auf diesen Prozeß ausübt. Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht (Herrmann, 1986, 1987).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Messung isometrischer Spannungsänderungen und unter-schwelliger Sarkomeroszillationen

2.1.1 Präparation und Meßtechnik

Für die Versuche wurde im allgemeinen der Musculus semitendinosus und in wenigen Fällen der M. iliofibularis des Grasfro-sches (Rana temporaria L.) verwendet.

Die Präparation intakter Einzelfasern erfolgte nach der von Lüttgau (1965) beschriebenen Methode. Eine einzelne Muskelfa-ser wurde über eine Länge von mindestens zehn Millimetern freipräpariert und an einem Ende mit einem dünnen Faden chi-rurgischer Seide versehen, mit dem das Präparat in der Ver-suchsanordnung fixiert werden konnte. In der temperaturkon-trollierten Versuchskammer (s. Abb. 2.1) wurde ein Faserende mit dem Faden am Arm eines mechano-elektrischen Transducers (RCA 5734; Empfindlichkeit: 190 mV/mN) befestigt, das andere Ende wurde mit einer sehr feinen Insektennadel in der Sylgard-schicht (Sylgard 184, Dow Corning) der Versuchskammer festge-steckt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators ließ sich die Faser horizontal ausrichten. Die isometrische Kraftentwicklung wurde parallel über ein Speicheroszilloskop (564 B, Tektronix) und einen 2-Kanal-Schreiber (Varioscript 442, Schwarzer) aufge-zeichnet.

Sarkomeroszillationen, die unterhalb der Meßschwelle der Appa-ratur zur Kraftmessung lagen, wurden mit Hilfe eines Lasers sichtbar gemacht. Auf die Muskelfaser wurde senkrecht zur Fa-serachse der Strahl eines He-Ne-Lasers (PL 710, Polytec; Wel-lenlänge = 632,8 nm, Ausgangsleistung = 1,5 mW, Strahldurch-messer = 0,75 mm, unpolarisiert) gerichtet. Zur Vermeidung von Streuungseffekten besaß die Perspex-Versuchskammer im Boden ein Fenster aus Objektträgerglas (Stärke = 1 mm). Um den Durchmesser des Laserstrahls zu reduzieren, wurde der Strahl

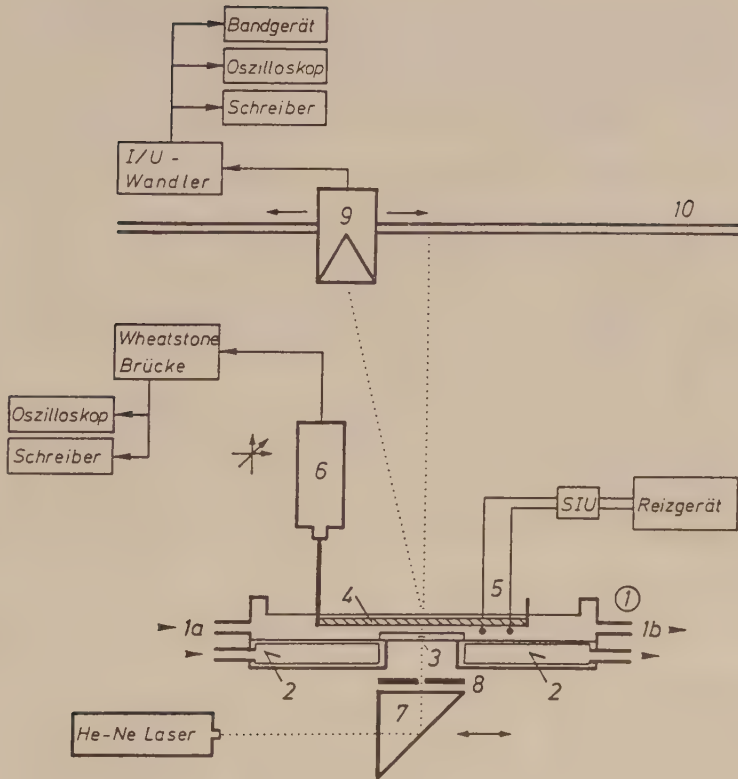


Abb. 2.1

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung

- 1 Versuchskammer aus Perspex
- 1a Zulauf für die Badflüssigkeit
- 1b Absaugung für die Badflüssigkeit
- 2 Kühlkreislauf
- 3 Glasfenster (Stärke = 1 mm)
- 4 Muskelfaser
- 5 Extrazelluläre Reizelektroden
- 6 Mechano-elektrischer Transducer
- 7 Gleichschenklig-rechtwinkliges Prisma
- 8 Lochblende (Durchmesser = 200 μ m)
- 9 Photodiode
- 10 Gewindestange

Die Pfeile zeigen die Bewegungsmöglichkeiten einzelner Teile der Apparatur an.

vor Eintritt in die Versuchskammer durch eine Lochblende von 200 μm Durchmesser gelenkt. In einer Ebene 420 Millimeter oberhalb des Präparates war eine Photodiode (BPY 61 IV, Siemens; bestrahlungsempfindliche Fläche = $0,17 \text{ mm}^2$) befestigt, die an einer Gewindestange parallel zur Faser bewegt werden konnte. Das Beugungsbild ließ sich auf diese Weise an jedem Punkt zwischen dem Haupt- und dem ersten Beugungsmaximum abtasten. Wenn nicht anders angegeben, war die Photodiode im ersten Beugungsmaximum positioniert. Das Ausgangssignal der Photodiode wurde über einen Stromspannungswandler auf einem Speicheroszilloskop (D 11, Tektronix) und einem Schreiber (s. o.) parallel aufgezeichnet. Zur Frequenzanalyse wurden die Signale mit einem Magnetbandgerät (Store 4D, Racal Records bzw. VR 3200, Bell & Howell) aufgenommen.

In einigen Versuchen wurde zusätzlich das Membranpotential der eingespannten Muskelfaser kontrolliert. Es wurde intrazellulär mit konventionellen Glas-Mikroelektroden gemessen, die mit 3 M Kaliumchlorid-Lösung gefüllt waren. Die zur Strominjektion verwendeten Mikroelektroden enthielten eine 2 M Kaliumcitrat-Lösung.

Zur optischen Kontrolle konnte in die Apparatur ein Stereomikroskop (Standard RA, C. Zeiss) eingeschoben werden.

Die Präparation enthäuteter Skelettmuskelfasern wurde im wesentlichen nach der von Moisescu und Thieleczek (1978) beschriebenen Methode durchgeführt. Es wurde eine einzelne Muskelfaser freigelegt, von der über eine Länge von mindestens fünf Millimetern mit Hilfe spitzer Pinzetten das Sarkolemma entfernt wurde. Die gesamte Präparation erfolgte unter dickflüssigem Paraffinöl (Merck). In der Versuchskammer wurde das Präparat zwischen dem Arm eines mechano-elektrischen Transducers (s. o.) und einer feinen augenchirurgischen Pinzette befestigt.

Die Versuchskammer wurde für die Versuchsserie an der enthäuteten Faser durch eine Perspex-Kammer ersetzt, die zehn hintereinanderliegende Zellen (Volumen = 1 ml) für die Aufnahme verschiedener Badlösungen besaß. Im übrigen war die Versuchs-

kammer wie die zuvor beschriebene konstruiert. Die Zellen der Kammer wurden zur Einstellung der gewählten Temperatur mit Kühlflüssigkeit umspült. Zum Lösungswechsel ließ sich die Kammer sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung bewegen. Diese Methodik wurde ausführlich von Thieleczek (1982) dargestellt.

Der übrige Versuchsaufbau entsprach dem zuvor beschriebenen.

Vor Beginn eines jeden Versuchs wurden die Präparate jeweils 15 Minuten in Ringerlösung bzw. in einer Standard-Erschlaffungslösung (s. Tab. 2.2, Lösg. A1/B1) bei der entsprechenden Versuchstemperatur inkubiert, und es wurde der Durchmesser der Präparate bestimmt. Die Präparate wurden dazu soweit gedehnt, daß eine gerade meßbare Änderung der Ruhespannung zu registrieren war. Die Sarkomerlänge dieser schwach vorgedehnten Präparate betrug ca. $2,2 \mu\text{m}$. Um scharf konturierte Beugungslinien zu erhalten, wurden nur solche Präparate verwendet, die einen relativ großen Durchmesser besaßen ($d \geq 80 \mu\text{m}$) und optisch transparent erschienen.

2.1.2 Lösungen

2.1.2.1 Extrazelluläre Lösungen

Als Badlösungen für intakte Zellen wurden modifizierte Standard-Ringerlösungen nach Adrian (1956) verwendet (s. Tab. 2.1). Alle Lösungen besaßen bei einer Temperatur von 10°C einen pH-Wert von 7,40. Als Puffer wurde HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure: $pK = 7,55$ bei 20°C ; Serva) in einer Konzentration von 3 mM verwendet. Die Stammlösungen wurden mit 2 N NaOH- bzw. 2 N KOH-Lösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Alle verwendeten Chemikalien waren - wenn nicht anders angegeben - vom Reinheitsgrad "pro analysi".

Ein Entzug zweiwertiger Kationen aus der extrazellulären Bad-

Lösung	K^+ mM	Na^+ mM	Ca^{2+} mM	Mg^{2+} mM	HEPES mM	Cl^- mM	Prop. mM	SO_4^{2-} mM	Sacch. mM
Ringer	2,5	115	1,8	-	3	121,1	-	-	-
R _(Ca=0)	2,5	115	-	3,6	3	124,7	-	-	-
K1	20,0	100	2,0	-	3	-	124	-	-
K2	-	100	2,0	-	3	104,0	-	-	40
K3	-	100	2,0	-	3	-	-	-	40
190K	190,0	-	9,0	-	3	-	-	104	-

Tab. 2.1

Ionenzusammensetzung der am häufigsten verwendeten extrazellulären Badlösungen

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit NaOH bzw. KOH auf 7,40 eingestellt.

(HEPES = N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure,

Prop. = Propionat, Sacch. = Saccharose)

Lösung	K^+ mM	Na^+ mM	Mg^{2+} total mM	HDTA mM	EGTA mM	CaEGTA mM	TES mM	Mg^{2+} mM
A1	150,0	36	10,25	-	50	-	60	1,0
A2	148,6	36	8,45	50	-	-	60	1,0
A3	149,4	36	8,05	-	-	50	60	1,0
B1	150,0	36	3,35	-	50	-	60	0,1
B2	148,6	36	3,21	50	-	-	60	0,1
B3	149,4	36	3,17	-	-	50	60	0,1

Tab. 2.2

Zusammensetzung der Stammlösungen, die zur Herstellung der intrazellulären Badlösungen benutzt wurden

Alle Badlösungen enthielten 8 mM ATP, 10 mM Kreatinphosphat und 15 U/ml Kreatinkinase. Der pH-Wert der aktuellen Badlösungen wurde vor Versuchsbeginn exakt auf 7,00 ± 0,01 eingestellt.

(EGTA = Ethylenglykol-bis(2-amino-ethylether)-N,N'-tetraessigsäure,

HDTA = 1,6-Diaminohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, TES = N-Tris-(hydroxymethyl)methyl-2-amino-ethansulfonsäure)

lösung erhöht das Oberflächenpotential der Muskelzellmembran (Dörrscheidt-Käfer, 1976). Aufgrund dessen nimmt die Steilheit des Potentialgradienten in der Membran ab, was zu einer zunehmenden Labilität der Membran führt (De Mello, 1973). Der Abschirmungseffekt von Calciumionen ist jedoch größer als der von Magnesiumionen, da das Calciumion aufgrund seiner Größe und seiner komplizierteren Elektronenstruktur sowohl fester als auch spezifischer von Proteinen gebunden wird (Carafoli & Penniston, 1985). In Ca^{2+} -freien Lösungen wurde aus diesem Grunde Ca^{2+} durch eine 1,8-fache Konzentration an Mg^{2+} ersetzt. Diese Konzentration läßt sich als Mittelwert aus den Werten von Dörrscheidt-Käfer (1976) und De Mello (1973) berechnen.

Die Lösungen mit erhöhtem K^+ -Gehalt ergaben sich aus Mischungen der Lösungen K1 - K3 (Tab. 2.1). Das Produkt $(\text{K}^+)_{\text{O}} \times (\text{Cl}^-)_{\text{O}}$ wurde dabei konstant gehalten, um Nettobewegungen von K^+ - und Cl^- -Ionen über die Membran auszuschließen und somit die intrazelluläre Konzentration dieser Ionen konstant zu halten. Die Kontrakturellösung (190K) diente dazu, die vollständige Aktivierung der Muskelfaser zu garantieren (Hodgkin & Horowicz, 1960; Lüttgau & Spiecker, 1979).

Die verwendeten Pharmaka wurden in die entsprechenden Lösungen entweder direkt eingewogen oder aus konzentrierten Stammlösungen zugesetzt. Diese Stammlösungen wurden grundsätzlich in Ringerlösung angesetzt, um Konzentrationsänderungen der verschiedenen Ionenarten zu vermeiden.

2.1.2.2 Intrazelluläre Lösungen

Der große Vorteil der enthäuteten Muskelfaser liegt in der freien Zugänglichkeit des intrazellulären und myofibrillären Raumes. Dieses Faktum bedingt jedoch gleichzeitig komplexe Diffusionsprobleme, da die Ionenarten, die zur physiologischen Aktivierung notwendig sind, von außerhalb, d. h. aus der Bad-

lösung an die entsprechenden funktionellen Systeme (sarkoplasmatisches Retikulum (SR) und Myofilamente) gelangen müssen. Moisescu und Thieleczek (1978) gelang es, diese Diffusionsprobleme durch Verwendung geeigneter Badlösungen zu reduzieren. An dieser Stelle seien nur kurz die wesentlichen Merkmale dieser Lösungen zusammengestellt:

1. Die Erschlaffungslösungen besitzen eine sehr hohe Ca^{2+} -Pufferkonzentration von 50 mM EGTA (Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure, Serva), welche sicherstellt, daß die in der Lösung eingestellte freie Ca^{2+} -Konzentration auch der im intramyofibrillären Raum entspricht.
2. Dem eigentlichen Aktivierungsschritt muß eine Äquilibration des Präparates in einer intermediären Lösung mit geringer Pufferkapazität für das aktivierende Ion vorausgehen (s. Thieleczek, 1982). Zur Aufrechterhaltung der Ionenstärke wird der in der intermediären Lösung fehlende Ca^{2+} -Puffer durch eine Substanz mit geringer Ca^{2+} -Pufferkapazität, HDTA (1,6-Diaminohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Aldrich), nahezu ideal ersetzt.
3. Alle Lösungen enthalten eine sehr hohe Konzentration des pH-Puffers TES (N-Tris-(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure: $\text{pK} = 7,5$ bei 20°C ; Serva), um lokale Änderungen der Protonenkonzentration, die beispielsweise aus der ATP-Hydrolyse resultieren und letztlich auch den Aktivierungsschritt selbst beeinflussen können, weitgehend auszuschließen.

Die für die aktuellen Badlösungen verwendeten Stammlösungen (s. Tab. 2.2) wurden nach diesen Prinzipien hergestellt (zur Herstellung s. a. Ashley & Moisescu, 1977; Moisescu & Thieleczek, 1978). Die Zusammensetzung der Lösungen wird durch die geplanten Konzentrationen der einzusetzenden Kationen und die apparenten Bindungskonstanten der vorliegenden Liganden für diese Ionen bestimmt. ATP (Adenosin-5'-triphosphat- Na_2 -Salz, "Vanadium-frei", Sigma), Kreatinphosphat (Na_2 -Salz, purissimum, Serva) und Kreatinkinase (purissimum, Serva) wurden den Badlösungen stets erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zuge-

setzt; anschließend wurde der pH-Wert mit 4 N KOH exakt auf 7,00 $\pm$ 0,01 eingestellt. Alle verwendeten Salze waren - soweit zugänglich - vom Reinheitsgrad purissimum, um Verunreinigungen der Lösungen durch andere Metalle, insbesondere Calciumkontaminationen weitgehend zu reduzieren.

Die Lösungen vom Typ A und B (Tab. 2.2) unterschieden sich in ihrer freien Mg^{2+} -Konzentration. Die für die gewünschte freie Mg^{2+} -Konzentration benötigte Mg^{2+} -Gesamtkonzentration der Lösungen berechnet sich nach Ashley und Moisescu (1977) wie folgt:

$$[Mg_{total}] = [Mg^{2+}] + \sum_{i=1}^3 [L_i] \cdot ([Mg^{2+}] \cdot Kapp_{Mg}^{L_i}) \cdot (1 + [Mg^{2+}] \cdot Kapp_{Mg}^{L_i})^{-1}$$

$[Mg^{2+}]$ bezeichnet die freie Mg^{2+} -Konzentration, $Kapp_{Mg}^{L_i}$ die apparente Bindungskonstante (s. Tab. 2.3) des Liganden L_i (L_1 = EGTA bzw. HDTA, L_2 = ATP und L_3 = Kreatinphosphat). $[L_i]$ stellt die Konzentrationen der betreffenden Liganden dar.

Atomabsorptionsphotometrische Bestimmungen der totalen Mg^{2+} -Konzentration mit anschließender Berechnung der freien Mg^{2+} -Konzentration bestätigten die theoretischen Berechnungen (s. a. 2.3.3).

Für jeden Versuch wurde aus den Stammlösungen ein Satz von aktuellen Badlösungen zusammengestellt, der jeweils eine hoch EGTA-gepufferte Erschlaffungslösung (HR), eine niedrig gepufferte intermediäre Lösung (LR), eine Ladungslösung (Ca-I) und verschiedene Freisetzungslösungen (F) enthielt. Die Erschlaffungslösung HR enthielt 50 mM EGTA und war mit der Stammlösung A1 bzw. B1 identisch. Die intermediäre Lösung war im allgemeinen mit 0,1 mM EGTA gepuffert und ergab sich durch Mischen der Lösungen A1 (B1) und A2 (B2). Die Ladungslösung Ca-I wurde durch Mischen der Ca^{2+} -haltigen Stammlösungen A3 (B3) mit der hoch EGTA-gepufferten Stammlösung A1 (B1) hergestellt. Die freie EGTA-Konzentration der Ladungslösung betrug stets $\geq$ 10 mM, wobei die Höhe der EGTA-Pufferung von der freien

Ligand	Kation	Apparente Bindungskonstante M^{-1}	pH	Temperatur $^{\circ}C$	Referenz
EGTA	Ca^{2+}	$(5,0 \pm 0,5) \times 10^6$	7,10	0 - 23	(1)
	Ca^{2+}	$2,51 \times 10^6$	7,10	10	(2)
	Mg^{2+}	35 ± 5	7,10	10	(1)
	Mg^{2+}	40,45	7,10	10	(2)
HDTA	Ca^{2+}	$6,5 \pm 1,0$	7,10	0 - 23	(1)
	Ca^{2+}	8,13	7,10	10	(2)
	Mg^{2+}	$8,0 \pm 1,5$	7,10	0 - 23	(1)
	Mg^{2+}	7,41	7,10	10	(2)
ATP	Ca^{2+}	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^3$	7,10	10	(1)
	Ca^{2+}	$3,3 \times 10^3$	7,10	10	(2)
	Mg^{2+}	$(6,2 \pm 0,5) \times 10^3$	7,10	10	(1)
	Mg^{2+}	$7,5 \times 10^3$	7,10	10	(2)
CP	Ca^{2+}	≤ 20	7,10	0 - 23	(1)
	Mg^{2+}	$12 \pm 1,5$	7,10	0 - 23	(1)

(1) Thieleczek (1982)

(2) Fabiato & Fabiato (1979)

Tab. 2.3

Apparente Bindungskonstanten der Liganden der intrazellulären Badlösungen für die Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+}

Die verwendeten Abkürzungen sind dem Text bzw. Tab. 2,2 zu entnehmen.

Ca^{2+} -Konzentration abhing. Wegen der hohen apparenten Bindungskonstante von EGTA für Ca^{2+} kann man davon ausgehen, daß in den Stammlösungen A3/B3 das gesamte eingesetzte Ca^{2+} als CaEGTA vorliegt. Der pCa-Wert (pCa = negativer dekadischer Logarithmus der freien Ca^{2+} -Konzentration) der Ladungslösung mit einer niedrigen freien Mg^{2+} -Konzentration (0,1 mM) lag bei 7,0, der pCa-Wert der Ladungslösung mit höherer freier Mg^{2+} -Konzentration (1 mM) betrug 6,1. Die Freisetzungslösungen waren stets schwach mit EGTA gepuffert ($[\text{EGTA}_{\text{frei}}] = 0,1\text{--}0,5 \text{ mM}$) und enthielten zusätzlich ein aktivierendes Ion oder eine aktivierende Substanz. Die Substanzen wurden direkt in die Badlösungen eingewogen oder aus konzentrierteren Stammlösungen zugesetzt. Freisetzungslösungen, die das aktivierende Ion Ca^{2+} enthielten, ergaben sich durch Mischen der Lösungen A2 (B2) und Ca-I. Nominell Ca^{2+} -freie Lösungen (pCa $\geq 8,0$) wurden durch Mischen der Stammlösungen A1 (B1) und A2 (B2) hergestellt. Die freie Ca^{2+} -Konzentration wurde über die atomabsorptionsphotometrische Messung der totalen Ca^{2+} -Konzentration der Lösungen rechnerisch ermittelt (s. 2.3.3). Die aktuellen Badlösungen wurden nie länger als einen Tag verwendet, da die Haltbarkeit von ATP, Kreatinphosphat und Kreatinkinase in Lösung zeitlich limitiert ist.

2.2 Biochemische Methoden zur Analyse eines vom Muskel freigesetzten Materials

Neben den (elektro)physiologischen Messungen wurden biochemische Untersuchungen zur Analyse einer vom Muskel freigesetzten Modulators substanz durchgeführt. Ein Großteil der Untersuchungen entstand im Labor von Prof. Dr. P. Welzel in der Abteilung Chemie. Die Aminosäure-Analysen wurden im Labor von Dr. H. Meyer an der medizinischen Fakultät angefertigt.

2.2.1 Gewinnung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Für die Freisetzungsexperimente wurden der *M. cutaneus pectoris* und der *M. sartorius* verwendet. Für jede Aufarbeitung wurden acht Muskeln jeweils zwei Stunden lang in 8 ml 2 mM Koffein-Ringerlösung inkubiert. Die Badtemperatur wurde konstant auf 10 °C gehalten. Die oszillatorische Aktivität wurde während dieser Zeit über ein Stereomikroskop (s. o.) beobachtet. Es wurden nur solche Muskeln verwendet, deren gesamter Querschnitt von den Sarkomeroszillationen erfaßt war und in denen die Oszillationen über den gesamten Zeitraum von zwei Stunden registriert werden konnten. Dazu war bisweilen eine Streckung der Präparate notwendig. Das Trockengewicht der für eine Aufarbeitung verwendeten Muskeln, d. h. das Gewicht nach Entfernung der extrazellulären Lösung, variierte zwischen 650 und 800 mg. Nach zwei Stunden wurde die Badflüssigkeit aufgenommen und der pH-Wert bestimmt. Für die weitere Aufreinigung wurde das Flüssigkeitsvolumen bei maximal 40 °C im Rotationsverdampfer eingengt und in 2 ml Aqua bidest aufgenommen.

2.2.2 Gelfiltrations-Chromatographie: Abtrennung des Koffeins

Die Abtrennung des Koffeins von dem vom Muskel freigesetzten Material erfolgte mittels der Gelfiltrations-Chromatographie. Bei dieser Methodik werden Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte getrennt. Als Säulenmaterial wurde Sephadex G-10 (40-120 µ, Sigma) gewählt. Es handelt sich um ein Dextran-Gel, das sich insbesondere zur Abtrennung kleinerer Substanzen eignet. Größere Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 1000 g/mol werden von den Gelpartikeln ausgeschlossen.

Die Säulenabmessungen betrugen 16 x 300 mm. Die Säule wurde mit Dextranblau 2000 (Pharmacia) und Kaliumhexacyanoferrat(II) kalibriert. Dextranblau wurde in den Fraktionen 17 - 21 (Fraktionen in ml), Kaliumhexacyanoferrat(II) in den Fraktionen

36 - 41 eluiert.

Das in 2 ml Aqua bidest gelöste Material wurde auf die Säule aufgetragen und mit 60 ml Puffer eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug $0,13 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Vorversuche zeigten, daß sich das Elutionsverhalten der Säule für das aufzutrennende Material nicht änderte, wenn die als Puffer verwendete Ringerlösung durch Aqua bidest ersetzt wurde. Da sich die im Elutionspuffer enthaltenen Salze für die weitere Aufreinigung und Aktivitätsmessungen als störend erwiesen, wurde im folgenden Aqua bidest als Elutionsmedium verwendet. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 1 ml aufgefangen und die optische Dichte einer jeden Fraktion anschließend im Photometer (55 B, Perkin-Elmer) bei einer Wellenlänge von 245 nm gemessen. Die Fraktionen, die das vom Muskel freigesetzte Material enthielten, wurden wiederum aufgenommen, eingeengt und in 2 ml des für die folgende Chromatographie verwendeten Laufmittels gelöst.

2.2.3 "Reversed phase"-Chromatographie: Auftrennung des Materials in verschiedene Komponenten

Die weitere Auftrennung des Materials erfolgte über die "reversed phase"-HPLC (high pressure liquid chromatography). Das Kriterium für die Trennung in diesem System ist die Polarität der Moleküle. Bei diesen Umkehrphasen ist im Gegensatz zur "normalen" Adsorptionschromatographie die stationäre Phase unpolar (hydrophob). Die Sorption (Retention) ist um so größer, je polarer der Eluent bzw. je unpolarer die zu chromatographierende Substanz ist; d. h. die Retention unpolarer Substanzen ist in diesem System am höchsten.

Es wurde eine präparative RP-18 - Säule (20 x 250 mm) verwendet, bei der das Trägermaterial mit Octadecyl-Siliconen (Polygosil, 60 - 10 C₁₈; Machery & Nagel) belegt war. Das Laufmittel setzte sich aus Methanol (p. A., Riedel-de-Haen), Wasser und Acetonitril (HPLC-Qualität, J. T. Baker) zusammen, wobei die einzelnen Anteile bei den verschiedenen Auftrennungen variierten.

Das Material wurde isokratisch mit einer Elutionsgeschwindigkeit von $4 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ bei einem Druck von 15 bar über die Säule eluiert (HPLC-Pumpe: M-6000A, Waters Associates Inc.). Die optische Dichte wurde kontinuierlich über einen UV-Detektor (LC 3, Pye Unicam) gemessen und auf einem 2-Kanal-Schreiber (PM 8221, Philips) in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.

Die für die Aktivitätsmessungen verwendeten Fraktionen wurden lyophilisiert und in die entsprechenden Aktivierungslösungen aufgenommen.

2.2.4 Bestimmung funktioneller Gruppen

2.2.4.1 Phosphat-Bestimmung

Die Phosphat-Bestimmung wurde nach der Methode von Ames und Dubin (1960) durchgeführt. Ihr liegt die Bildung eines Molybdatophosphat-Komplexes mit Ammoniummolybdat und anschließender Reduktion dieses Komplexes durch Ascorbinsäure zugrunde. Da die Reaktion sehr empfindlich ist, wurden nur säuregereinigte Glasgefäße verwendet. Die mit phosphathaltigen Reinigungsmitteln behandelten Gefäße enthielten soviel Phosphat, daß das Reagenz auch ohne zusätzliches Phosphat dunkel gefärbt wurde. Ein Aliquot einer jeden Probe wurde in ein Reagenzglas gegeben und das Lösungsmittel verdampft. Der Niederschlag wurde in 50 μl einer 10 % $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (10 % $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ in Ethanol (w/v)) gelöst und weiter erhitzt, bis keine nitrosen Gase mehr entwichen. Zu jeder Probe wurden 0,3 ml 1 N HCl pipettiert. Dieses Gemisch wurde 15 Minuten lang gekocht, um Diphosphate, die während des Veraschungsprozesses entstehen können, zu Orthophosphat zu hydrolysieren. Im Anschluß wurden die Proben mit 0,7 ml einer Ascorbinsäure-Molybdat-Lösung (1 Teil 10 % Ascorbinsäure-Lösung und 6 Teile 0,42 % Ammoniummolybdat-Lösung (in 1 N H_2SO_4)) versetzt und 20 Minuten lang bei 45 °C inkubiert. Der Phosphatgehalt einer jeden Probe wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 820 nm bestimmt.

2.2.4.2 Nachweis freier Aminogruppen

Freie Aminogruppen lassen sich u. a. über die Ninhydrin-Reaktion nachweisen. Eine α -Aminosäure reagiert mit zwei Molekülen Ninhydrin über die Bildung eines Zwischenproduktes zu einem purpurnen Farbstoff, bei dem das enthaltene Stickstoffatom aus der Aminosäure stammt.

Die zu untersuchenden Proben wurden über "reversed phase"-Dünnschichtplatten (RP-18 F₂₅₄S, Merck) aufgetrennt. Als Laufmittel wurden Puffersysteme analog zu der "reversed phase"-HPLC verwendet (s. 2.2.3). Die Platten wurden nach Ablauf der Chromatographie getrocknet, mit Ninhydrin-Reagenz (0,1 %, Merck) besprüht und kurzzeitig bei 40 °C erhitzt. Die Farbreaktion wurde im Anschluß qualitativ ausgewertet.

2.2.5 PTC-Aminosäure-Analyse

Die PTC-Aminosäure-Analyse nutzt das Edman-Reagenz Phenylisothiocyanat für eine quantitative Derivatisierung freier Aminosäuren. Die Methode erlaubt es, über die "reversed phase"-HPLC freie Aminosäuren im Picomol-Bereich (10 - 20 Picomol pro Analysevolumen) zu bestimmen, wobei die Standardabweichung weniger als 10 % pro Aminosäure beträgt.

Es wurde jeweils der Gehalt an freien Aminosäuren einer nicht hydrolysierten im Vergleich zu einer hydrolysierten Probe bestimmt. Die Hydrolyse erfolgte in Gegenwart eines Überschusses an 6 N HCl bei 150 °C für 1 Stunde unter Stickstoffatmosphäre. Zur Detektion wurden die freien Aminosäuren vor der chromatographischen Trennung mit Phenylisothiocyanat (PITC) versetzt. PITC reagiert quantitativ mit der freien Aminogruppe einer Aminosäure zur entsprechenden Phenylthiocarbamylaminosäure (PTC-Aminosäure). Die Trennung der PTC-Aminosäuren erfolgte über die "reversed phase"-HPLC. Es wurde eine 3 μ m Spherisorb ODS-2 Säule (4,6 x 125 mm) verwendet, als Elutionsmittel wurde das Puffersystem III von Heinrikson und Meredith (1984) eingesetzt. Die Eluierung wurde bei pH 6,8 mit zwei verschiedenen

Puffern (A/B) von abnehmender Polarität durchgeführt. Als Startpuffer A diente eine 0,05 M Ammoniumacetatlösung. Das Puffersystem B setzte sich aus 0,1 M Ammoniumacetat, gelöst in Acetonitril, Methanol und Wasser im Verhältnis 44:10:46 zusammen. Das PTC-Derivat einer jeden Aminosäure wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei die Stoffmenge über die Fläche unter dem entsprechenden Absorptionsspeak berechnet wurde.

2.3. Versuchsauswertung

Die im Ergebnisteil angegebenen Werte und Abbildungen sind jeweils den Aufzeichnungen eines repräsentativen Versuchs entnommen. Durchschnittlich wurden vier bis elf Experimente zu jedem Versuchsteil durchgeführt. Auf eine Mittelung der Werte wurde im allgemeinen verzichtet, da die relativen Meßwerte zwar konstant sind, die absoluten Werte jedoch aufgrund verschiedener Faktoren wie Beschaffenheit des Tiermaterials, Präparation, Größe des Präparates etc. schwanken können.

2.3.1 Messung der Sarkomerlänge

Eine Skelettmuskelfaser verhält sich aufgrund der Periodizität von anisotropen (A-) und isotropen (I-) Banden annähernd wie ein eindimensionales Beugungsgitter (Sandow, 1936). Wird eine quergestreifte Muskelfaser von einem monochromatischen Lichtstrahl, der senkrecht auf die Faserachse gerichtet ist, illuminiert, so kann man auf einem Schirm, der im rechten Winkel zur Ebene des Lichtstrahls angeordnet ist, ein Spektrum diskreter Lichtlinien beobachten. Dieses Spektrum wird als Beugungsspektrum interpretiert, das aus den unterschiedlichen Refraktionsindices der regelmäßig angeordneten A- und I-Banden resultiert.

Bei der Beugung am Gitter entstehen Helligkeitsmaxima, für die folgende Beziehung gilt:

$$(1) \quad \sin \alpha = \frac{m \cdot \lambda}{g}$$

mit α = Beugungswinkel, λ = Wellenlänge des einfallenden Lichtes, g = Gitterkonstante, $m = 1, 2, 3, \dots$

In der ursprünglichen Lichtrichtung liegt für $m = 0$ das Helligkeitsmaximum des ungebeugten Anteils des einfallenden Lichtstrahls. Rechts und links folgen symmetrisch für $m = 1, 2, 3, \dots$ die Maxima 1., 2., 3., ... Ordnung (s. a. Abb. 2.2.a). Ersetzt man in (1) die Gitterkonstante g durch die Sarkomerlänge SL , so läßt sich mit dieser Formel in guter Annäherung die Beugung des Lichtes an einer einzelnen Muskelfaser beschreiben:

$$(2) \quad SL = \frac{m \cdot \lambda}{\sin \alpha}$$

mit SL = Sarkomerlänge in μm und λ = Wellenlänge des einfallenden Lichtes ($0,633 \mu\text{m}$).

In den hier vorgestellten Experimenten war der Winkel α jedoch unbekannt, und die Sarkomerlänge mußte aus den Abständen der einzelnen Beugungsmaxima von der Linie 0. Ordnung bestimmt werden.

Es gilt:

$$(3) \quad \tan \alpha = \frac{|M1-M0|}{l}$$

wobei $|M1-M0|$ den Abstand zwischen der Linie 0. Ordnung und 1. Ordnung und l den Abstand der Muskelfaser von der sensitiven Fläche der Photodiode bezeichnet (s. Abb. 2.2.b).

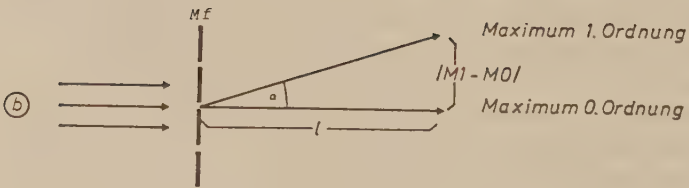
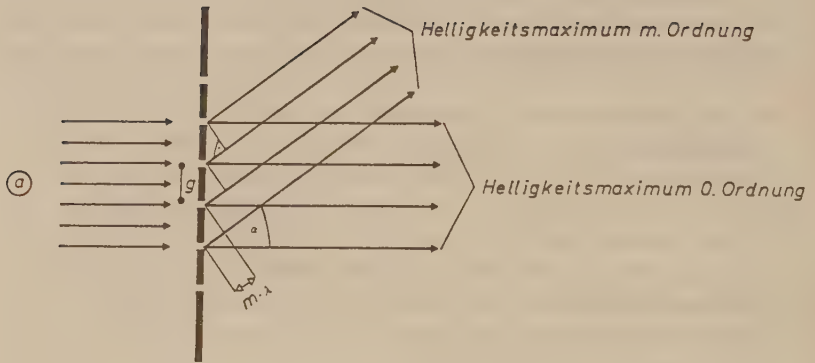


Abb. 2.2

Text siehe folgende Seite

Abb. 2.2

a) Schematische Darstellung der Beugung am Gitter

Auf ein eindimensionales Beugungsgitter trifft der gebündelte Lichtstrahl einer monochromatischen, punktförmigen Lichtquelle. In der durch den Winkel α gegebenen Richtung vereinigt sich das aus den Gitterspalten austretende Licht gleicher Phase. Es entsteht ein Helligkeitsmaximum m -ter Ordnung ($m = 1, 2, 3, \dots$).

(g = Gitterkonstante, α = Beugungswinkel, λ = Wellenlänge des einfallenden Lichtes)

b) Messung der Sarkomerlänge (schematisch)

Eine Muskelfaser (Mf), hier repräsentiert durch ein eindimensionales Beugungsgitter, wird senkrecht zur Faserachse von einem Strahl monochromatischen Lichtes illuminiert. Das entstehende Beugungsspektrum wird auf einem Schirm oberhalb der Muskelfaser parallel zur Gitterebene abgebildet. Die Gitterkonstante, d. h. die Sarkomerlänge läßt sich aus dem Abstand der Linie 0. und 1. Ordnung $|M_1 - M_0|$ und dem Abstand l von Muskelfaser und Schirm nach der Formel zur Beugung des Lichtes (s. Text) berechnen.

Aus (3) folgt

$$(4) \quad SL = \frac{m \cdot \lambda}{\sin[\arctan(|M1-M0|/l)]} \quad .$$

Bei der Messung der Sarkomerlänge wurde stets die mittlere Sarkomerlänge einer bestimmten Anzahl von Sarkomeren bestimmt. Der Durchmesser des Laserstrahls wurde vor Eintritt in die Versuchskammer durch eine Lochblende auf 200 μm reduziert. Legt man eine Sarkomerlänge von 2,5 μm zugrunde, so wurden von dem einfallenden Lichtstrahl durchschnittlich 80 Sarkomere erfaßt. Der Abstand der daraus resultierenden Beugungslinien wurde zur Berechnung der Sarkomerlänge eingesetzt.

Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Beschreibung der Muskelfaser als eindimensionales Gitter zur Erklärung verschiedener Beugungsphänomene nicht ausreicht, da Volumeneffekte aufgrund unterschiedlicher Gitterebenen, die von Bündeln einzelner Fibrillen gebildet werden, unberücksichtigt bleiben. Stattdessen wird eine dreidimensionale Betrachtungsweise vorgeschlagen, wobei zur mathematischen Beschreibung der Bragg- bzw. der Ewald-Formalismus herangezogen wird (vgl. Leung, 1984; Rüdell & Zite-Ferenczy, 1979; Zite-Ferenczy, Häberle, Rüdell & Wilke, 1986).

Eine Diskussion dieser Problematik findet sich im Anhang 5.1: "Die quergestreifte Muskelfaser als dreidimensionales Beugungsgitter".

2.3.2 Frequenzanalyse der Lichtsignale

Kumbaraci und Nastuk (1982) bestimmten die Frequenz der Sarkomeroszillationen, indem sie die oszillierenden Muskelfasern mit einer Hochgeschwindigkeitskamera in zeitlichen Abständen von 40 - 80 μs photographierten und die Periodendauer einzelner oszillierender Sarkomere auswerteten. In den hier vorliegenden Untersuchungen wurden die Sarkomeroszillationen als

Fluktuationen der Lichtintensität einzelner Beugungslinien aufgezeichnet, und es wurde ein numerisches Verfahren zur Beschreibung dieser Intensitätsschwankungen entwickelt.

Für die Frequenzanalyse wurden die Lichtsignale analog auf einem Magnetbandmeßgerät aufgenommen (s. 2.1.1) und in den Rechner (1600-4, Columbia) eingelesen und abgespeichert. Als Abtastfrequenz wurde 100 s^{-1} gewählt. Das "Abtasttheorem von Shannon" besagt, daß die Abtastfrequenz mehr als doppelt so hoch wie die höchste im Signal enthaltene Frequenz gewählt werden muß: $f_{\text{abtast}} \geq 2 \cdot f_{\text{max}}$. Der daraus folgend auswertbare Bereich von 50 s^{-1} liegt deutlich über dem für die spätere Auswertung interessanten Bereich von 0 bis 12 s^{-1} . Auf diese Weise konnte jedoch der Rauschanteil in diesem Frequenzbereich gegenüber einer niedrigeren Abtastrate wesentlich reduziert werden.

Aus den Untersuchungen von Kumbaraci und Nastuk (1982) ließ sich nicht entnehmen, ob sich die Sarkomeroszillationen evtl. mit einer einfachen harmonischen Schwingung beschreiben lassen, das Signal allgemein periodischen Schwingungen, d. h. periodischen nicht-sinusförmigen Schwingungen zuzuordnen oder rein stochastischer Natur ist. Aus diesem Grunde wurden verschiedene Analyseverfahren getestet. Die Cepstrumanalyse (Bogert, Healy & Tukey, 1963) zeigte, daß in dem Signal keine feste Grundfrequenz enthalten ist (Schippers, 1985), d. h. daß es sich um ein nicht determiniertes stochastisches Signal handelt. Aus der statistischen Signalanalyse bieten sich u. a. die Methoden der Abschätzung des Leistungsdichtespektrums und der Abschätzung der Autokorrelationsanalyse an. Da für eine exakte Auswertung der Autokorrelationsanalyse sehr lange Meßwertfolgen hätten verarbeitet werden müssen, erwies sich das Verfahren der Abschätzung des Leistungsdichtespektrums als günstiger für die Auswertung der Signale. Die im folgenden benutzten Begriffe aus der Schätztheorie und statistischen Signalanalyse sind im Anhang 5.2: "Theoretische Grundlagen der statistischen Signalanalyse" definiert.

Das Leistungsdichtespektrum einer Meßwertfolge $x(n)$ der Länge N läßt sich nach Oppenheim und Schafer (1978) in erster Näherung durch das Periodogramm $I_N(\omega)$

$$(1) \quad I_N(\omega) = \frac{1}{N} |X(e^{j\omega})|^2$$

beschreiben, wobei $X(e^{j\omega})$ als die diskrete Fouriertransformierte der Meßwertfolge $x(n)$ definiert ist und ω die Frequenz bezeichnet.

I_N ist jedoch keine konsistente Schätzfunktion des Leistungsdichtespektrums (Oppenheim & Schafer, 1978), d. h. der Schätzwert des Periodogramms I_N für unendlich viele Meßwerte $x(n)$ konvergiert nicht gegen den theoretischen Erwartungswert. Oppenheim und Schafer (1978) zeigten, daß dennoch das Verfahren der Mittelung von Periodogrammen konsistent ist (s. 5.2). Bei diesem Verfahren wird die Meßwertfolge $x(n)$ der Länge N in K Segmente der Länge M zerlegt. Für jedes einzelne Segment wird das Periodogramm $I_M^{(i)}(\omega)$ berechnet:

$$(2) \quad I_M^{(i)}(\omega) = \frac{1}{M} |X^{(i)}(e^{j\omega})|^2$$

Die konsistente Schätzfunktion $B(\omega)$ ergibt sich als Mittelung der Periodogramme $I_M^{(i)}$:

$$(3) \quad B(\omega) = \frac{1}{K} \sum_{i=1}^K I_M^{(i)}(\omega) \quad \text{mit } N = K \cdot M$$

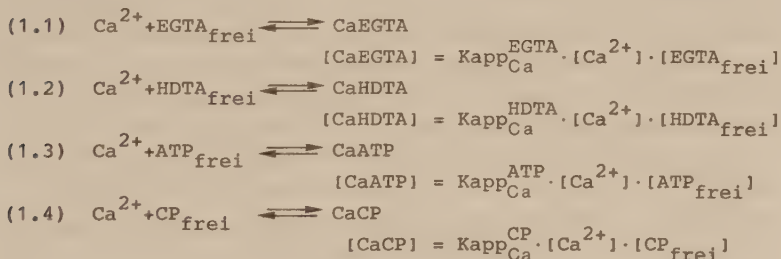
Die Signalverarbeitung erfolgte über ein von Schippers (1985) entwickeltes Programm zur Mittelung von Periodogrammen in der Programmiersprache Pascal. Es wurden jeweils Meßwertfolgen der Länge 80 - 100 s in den Rechner (s. o.) eingelesen, die in 8 - 10 Segmente der Länge 10 s unterteilt wurden. Von jedem Segment wurde das Leistungsdichtespektrum erstellt mit anschließender Mittelung dieser Spektren. Die gemittelten Spektren ließen sich linear - Zeitachse und Betragsachse waren

linear - am Bildschirm darstellen und über einen Plotter (7470A, Hewlett-Packard) aufzeichnen.

2.3.3 Bestimmung der freien Ca^{2+} -Konzentration

Die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration der Muskelfaser im Ruhezustand beträgt ca. 10^{-7} M und erhöht sich während der Aktivierung auf $1 - 5 \times 10^{-5}$ M. Das Problem bei der Herstellung intrazellulärer Lösungen liegt in der Einstellung einer definierten freien Ca^{2+} -Konzentrationen in dieser Größenordnung. Die freie Ca^{2+} -Konzentration intrazellulärer Lösungen wird bestimmt durch die Anwesenheit der Ca^{2+} -bindenden Moleküle ATP, Kreatinphosphat (CP) und der Chelatbildner EGTA und HDTA, wobei die Affinität von HDTA für Ca^{2+} vernachlässigbar gering ist (s. Tab. 2.3).

Die Bindung von Ca^{2+} an die verschiedenen Liganden läßt sich unmittelbar aus dem Massenwirkungsgesetz ableiten und ist determiniert durch die apparenten Bindungskonstanten ($K_{\text{app}}^{\text{Li}}$) der Liganden für Ca^{2+} :



Nach dem Massenerhaltungsgesetz gilt:

$$\begin{aligned}
 (2.1) \quad & [\text{EGTA}_{\text{total}}] = [\text{EGTA}_{\text{frei}}] + [\text{CaEGTA}] \\
 (2.2) \quad & [\text{HDTA}_{\text{total}}] = [\text{HDTA}_{\text{frei}}] + [\text{CaHDTA}] \\
 (2.3) \quad & [\text{ATP}_{\text{total}}] = [\text{ATP}_{\text{frei}}] + [\text{CaATP}] \\
 (2.4) \quad & [\text{CP}_{\text{total}}] = [\text{CP}_{\text{frei}}] + [\text{CaCP}]
 \end{aligned}$$

Daraus folgt

$$(3.1) \quad [\text{CaEGTA}] = [\text{Ca}^{2+}] \cdot \frac{\text{Kapp}_{\text{Ca}}^{\text{EGTA}} \cdot [\text{EGTA}]_{\text{frei}}}{1 + [\text{Ca}^{2+}] \cdot \text{Kapp}_{\text{Ca}}^{\text{EGTA}}} \quad .$$

Die Berechnung für die anderen Liganden erfolgt analog.

Die apparenten Bindungskonstanten von ATP und CP sind um die Größenordnung 10^3 und 10^5 kleiner als die von EGTA. Vernachlässigt man die Bindung von Ca^{2+} an ATP und CP, so berechnet sich die freie Ca^{2+} -Konzentration als

$$(4) \quad [\text{Ca}^{2+}] = \frac{[\text{CaEGTA}]}{[\text{EGTA}]_{\text{frei}}} \cdot (\text{Kapp}_{\text{Ca}}^{\text{EGTA}})^{-1} \quad ,$$

d. h. die freie Ca^{2+} -Konzentration ist im wesentlichen durch das Verhältnis von CaEGTA zu freiem EGTA bestimmt.

Diese Berechnung diente zur praktischen Herstellung von Lösungen mit einer definierten Ca^{2+} -Konzentration. - Als apparente Bindungskonstanten wurden die von Thieleczek (1982) experimentell bestimmten Bindungskonstanten eingesetzt. - Diese Abschätzung war jedoch ungeeignet zur Bestimmung einer unbekannten Ca^{2+} -Kontamination einer Lösung. Unberücksichtigt blieben ebenfalls die Bindungen von anderen zweiwertigen Kationen an die Liganden. Die Bindung von Mg^{2+} an EGTA kann aufgrund der geringen Affinität von EGTA für Mg^{2+} ($\text{Kapp}_{\text{Mg}}^{\text{EGTA}} = 35 \text{ M}^{-1} \ll \text{Kapp}_{\text{Ca}}^{\text{EGTA}} = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) in (4) vernachlässigt werden. Dies gilt jedoch nicht für die Liganden ATP und CP, deren Bindungskonstanten für Ca^{2+} und Mg^{2+} nahezu gleich groß sind (s. Tab. 2.3).

Zur exakten Bestimmung der freien Ca^{2+} -Konzentration wurde die totale Ca^{2+} -Konzentration der Badlösungen im Atomabsorptionsphotometer (272, Perkin-Elmer) gemessen und daraus rechnergestützt die freie Ca^{2+} -Konzentration berechnet. Als Referenz für die atomabsorptionsphotometrischen Messungen diente eine Serie von Eichlösungen, die eine definierte Ca^{2+} -Konzentration

besaßen und den jeweiligen Badlösungen entsprechende Konzentrationen an Ca^{2+} -bindenden Moleküle L_i . Die freie Ca^{2+} -Konzentration wurde über ein Fortran-Programm berechnet, das von Melzer (unveröffentlicht) in Anlehnung an ein Programm von Fabiato und Fabiato (1979), "Calculation of free ion concentrations from specified total concentrations", entwickelt wurde.

Bezieht man nur einen Liganden (z. B. EGTA) und ein Metall (z. B. Ca^{2+}) in die Berechnung ein, so läßt sich die freie Ca^{2+} -Konzentration aus einer gegebenen totalen Ca^{2+} -Konzentration über eine einfache quadratische Gleichung bestimmen. Liegen mehrere Liganden und mehrere Metalle vor, so sind komplexere Gleichungssysteme höherer Ordnung, die sich nicht mehr explizit lösen lassen, anzuwenden. Iterative, numerische Verfahren werden zur Berechnung notwendig. Das verwendete Programm erlaubt es, freie Ionenkonzentrationen aus gegebenen totalen Konzentrationen in Anwesenheit von bis zu fünf Metallen und vier Liganden zu ermitteln.

Als divalente Kationen wurden Ca^{2+} und Mg^{2+} eingesetzt, als Liganden EGTA, HDTA, ATP und CP. Die apparenten Bindungskonstanten von Fabiato und Fabiato (1979) wurden übernommen (s. Tab. 2.3).

3. E R G E B N I S S E

3.1 Sarkomeroszillationen in der intakten Skelettmuskelfaser

3.1.1 Standardbedingungen für das Auftreten von Sarkomeroszillationen

Kumbaraci und Nastuk (1982) beschrieben für den Skelettmuskel eine unterschwellige Aktivierung einzelner Sarkomere, welche durch niedrige Konzentrationen an Koffein induziert wurde. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur an ganzen Muskelpräparaten des *M. sartorius* durchgeführt. In Gegenwart von 1 mM Koffein beobachteten die Autoren kleine, asynchrone Bewegungen einzelner Sarkomere, die unabhängig voneinander auftraten. Die Sarkomeroszillationen konnten im Bereich der kontraktile Schwelle potentialabhängig ausgelöst werden und schienen daher in den Prozeß der elektro-mechanischen Kopplung einzugreifen.

Um dieses Phänomen zu reproduzieren, wurden zunächst einige Vorversuche an ganzen Muskelpräparaten des *M. cutaneus pectoris* durchgeführt. Der Muskel besteht nur aus wenigen parallelen Zellschichten und erscheint im Lichtmikroskop nahezu transparent. Die einzelnen Sarkomerbanden ließen sich über ein Wasserimmersionsobjektiv (40x/N.A.=0,75; C. Zeiss) bei einer 200-fachen Vergrößerung optisch auflösen.

Die Sarkomeroszillationen setzten ohne Verzögerung sofort nach Koffeinzugabe lokal an einigen Punkten der Muskeleoberfläche ein. Die Anzahl der aktiven Zentren nahm zu, bis nach wenigen Minuten schließlich der gesamte Muskelquerschnitt von den Sarkomeroszillationen erfaßt war. Durch Fokussierung verschiedener Schärfeebenen wurde deutlich, daß die Oszillationen nicht nur in oberflächennahen, sondern auch in tiefergelegenen Zellschichten auftraten. In der Regel konnte die oszillatorische Aktivität über zwei Stunden aufrechterhalten werden. Nach die-

sem Zeitraum nahm die Zahl der aktiven Zentren ab, und die Frequenz der Oszillationen ging zurück.

Die Oszillationen zeigten keinerlei Synchronisation und schienen unabhängig voneinander aufzutreten. Kumbaraci und Nastuk (1982) beschrieben eine zunehmende Synchronisation nach längerer Koffeineinwirkung in Form fortgeleiteter langsamer Wellen, die sich von einem Faserende zum anderen erstreckten. Dieses Phänomen konnte in dieser Weise nicht reproduziert werden. In einigen Präparaten waren in oberflächennahen Zellschichten nach längerer Inkubation der Präparate in Koffein-Ringerlösung derartige fortgeleitete Wellen zu beobachten, die jedoch nur unregelmäßig auftraten.

Die oszillatorische Aktivität war unmittelbar mit der Temperatur korreliert. Oberhalb von 15 °C ließen sich Oszillationen nicht mehr reproduzierbar auslösen. Erhöhte man die Koffeinkonzentration, so wurden zunächst Oszillationen initiiert, die aber nie länger als 15 Minuten aufrechterhalten werden konnten. Im unteren Temperaturbereich - bis zu 4 °C - war keine Einschränkung festzustellen. Als Versuchstemperatur wurde eine mittlere Temperatur von 10 °C gewählt. Die Versuchslösungen wurden auf dieselbe Temperatur vorgekühlt, um Temperatureffekte beim Lösungswechsel zu vermeiden. Die strenge Kopplung der Oszillationen mit der Temperatur weist auf einen stoffwechselabhängigen Vorgang hin und steht in guter Übereinstimmung mit einem im weiteren diskutierten intrazellulären Wirkungsmechanismus.

Während in Herzmuskelzellen auch spontane Oszillationen der Kraft und intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auftreten (vgl. Allen et al., 1984; Wier et al., 1983), wurden die hier beschriebenen Oszillationen ausschließlich durch Koffein induziert. Die Schwellenkonzentration, d. h. die minimal notwendige Konzentration zur Auslösung der Oszillationen betrug 2 mM Koffein, die in einigen Präparaten auf 1,8 mM reduziert werden konnte. Höhere Koffeinkonzentrationen lösen in der Skelettmuskelfaser Kontraktionen aus (Axelsson & Thesleff, 1958). Die

hier verwendete Koffeinkonzentration lag knapp unter der Kontrakturschwelle, so daß in der Mehrzahl der Experimente keine Kontraktur registriert wurde. Entwickelte die Muskelfaser dennoch eine Kontraktur, setzten die Oszillationen schon während der Kontrakturphase ein. Es war jedoch keine Abhängigkeit zwischen diesen beiden physiologischen Vorgängen erkennbar.

3.1.2 Laserlichttechnische Messung der Sarkomeroszillationen

Während Kumbaraci und Nastuk (1982) zur Dokumentation das oszillierende Muskelpräparat photographierten und anschließend die Periodenlängen einzelner oszillierender Sarkomere auswerten, um eine Aussage über Ausmaß und Frequenz der Oszillationen machen zu können, sollte für das hier verwendete Einzelfaserpräparat eine direkte Meßmethode entwickelt werden. Oszillatorische Signale in Herzmuskelzellen sind oft von zyklischen Fluktuationen der Kraft begleitet (Allen et al., 1984; Kort, Lakatta, Marban, Stern & Wier, 1985). In den hier untersuchten oszillierenden Muskelfasern ließen sich jedoch im Rahmen des verwendeten Meßsystems (s. 2.1.1) keine zyklischen Veränderungen der isometrischen Kraftentwicklung messen. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der Asynchronität der Sarkomeroszillationen, so daß keine koordinierte Kraftentwicklung entlang der Faser entstehen kann. Ebenso waren auch keine zyklischen Schwankungen des Membranpotentials, die mit den optisch sichtbaren Oszillationen korrelierten, zu verzeichnen. Somit fielen konventionelle Meßmethoden der Elektrophysiologie zur Registrierung der Oszillationen weg, und es wurde stattdessen ein optisches Meßverfahren, die Laserlichttechnik, verwendet. Eine verwandte Methode ("scattered light intensity fluctuations") nutzten Stern, Kort, Bhatnagar und Lakatta (1983) zur Messung mechanischer Oszillationen in ventrikulären Papillarmuskeln. Die Lasertechnik erwies sich als äußerst empfindliches Meßinstrument, das auf kleinste Veränderungen innerhalb der Struktur der Muskelfaser reagierte. In einer ersten Versuchsserie wurden im Vergleich Kontraktionen und Sar-

komeroszillationen als Veränderung der Lichtintensität und die Beugungsspektren von oszillierenden und nicht-oszillierenden Fasern aufgezeichnet.

Wird eine einzelne Muskelfaser von einem monochromatischen Lichtstrahl illuminiert, erhält man analog zu einem ebenen Gitter ein Beugungsspektrum mit den charakteristischen Beugungslinien (s. 2.3.1). Die Beugungsmaxima erschienen als scharf konturierte Linien, die in sich, insbesondere in den Randzonen, weitere Submaxima aufwiesen.

Abb. 3.1 zeigt eine einzelne Kontraktion einer Muskelfaser, die als Lichtintensitätsänderung über eine Photodiode und dazu parallel als Spannungstransient über einen mechano-elektrischen Transducer gemessen wurde. Die aufzeichnende Photodiode wurde im ersten Beugungsmaximum positioniert. Die Lichtintensität sank zu Beginn des Reizes innerhalb weniger Millisekunden auf ein Minimum ab, um anschließend in einer langsamen Rückkehrphase wieder auf den ursprünglichen Intensitätswert anzusteigen. Das Minimum der Lichtintensität war bereits vor dem Maximum des Spannungstransienten erreicht. Umgekehrt war die Kraftentwicklung bereits abgeschlossen, bevor die Lichtintensität wieder ihren ursprünglichen Wert erreicht hatte. Eine quantitative Auswertung der Amplitude der Lichtintensitätsänderung erweist sich jedoch als problematisch, da aufgrund Bragg'scher Reflexionen innerhalb der Muskelfaser die Lichtintensitätsänderung vielfach nicht proportional zur Kraftentwicklung verläuft (s. a. 5.1).

Koffein-induzierte Sarkomeroszillationen waren als Fluktuationen innerhalb der einzelnen Beugungslinien erkennbar. Die kleinen Bewegungen einzelner Sarkomere induzierten eine repetitive Zu- und Abnahme der Lichtintensität (Abb. 3.2). Wie schon im Lichtmikroskop zu erkennen war, verliefen diese Bewegungen unregelmäßig und wiesen keine strenge Periodizität auf. Eine mittlere Frequenz wurde daher als Mittelung über K verschiedene Zeitintervalle ($K = 8-10$) numerisch ermittelt. Die statistische Analyse ist im Methodikteil (2.3.2) ausführlich beschrieben. Unmittelbar nach dem Lösungswechsel war stets

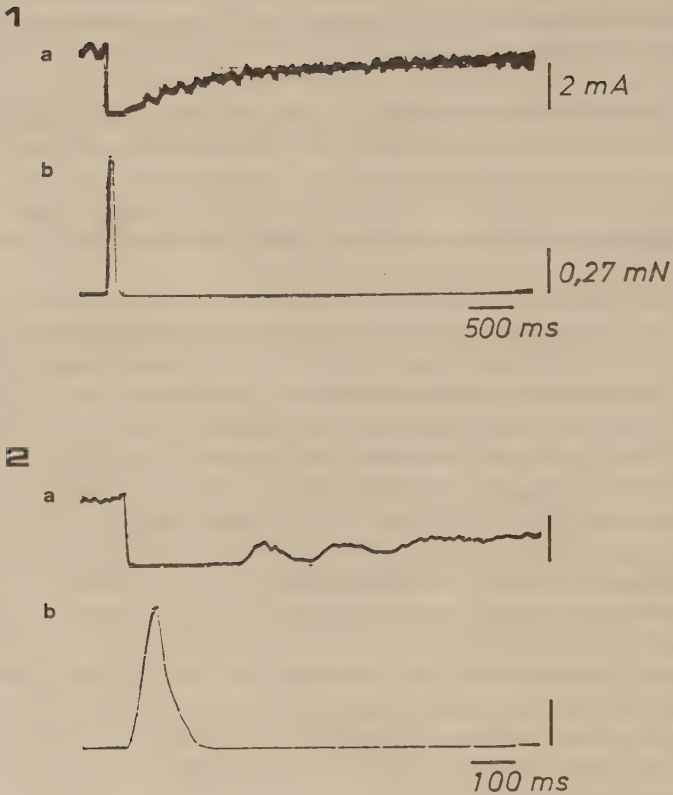


Abb. 3.1

Kontraktionen einer einzelnen Muskelfaser: Vergleich zweier Meßsysteme

- a: Lichtintensitätsänderung - gemessen über eine Photodiode - des ersten Beugungsmaximums während eines Einzelreizes
- b: Aufzeichnung desselben Krafttransienten über ein mechano-elektrisches Meßsystem

1 und 2 sind Aufzeichnungen desselben Krafttransienten, wobei die Zeitachse in 2 um den Faktor 5 gespreizt wurde.

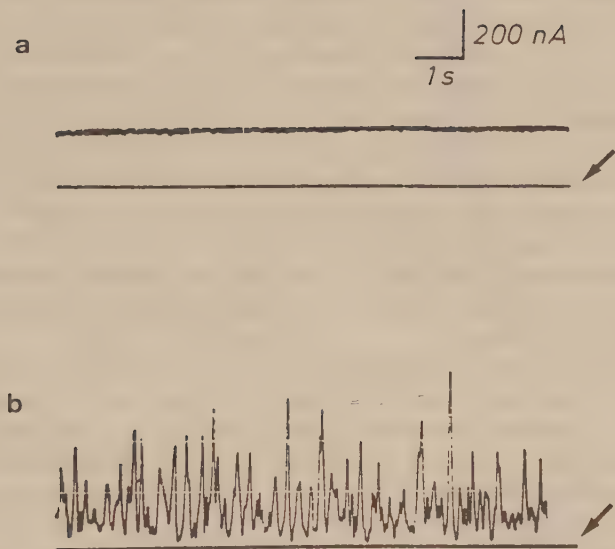


Abb. 3.2

Lichtintensitätsänderungen im ersten Beugungsmaximum einer inaktiven und einer oszillierenden Muskelfaser

a: inaktive Faser in Ringerlösung

b: oszillierende Faser in 2 mM Koffein-Ringerlösung

Die untere Linie (s. Pfeil) gibt jeweils das Intensitätsminimum an.

eine erhöhte Frequenz zu beobachten, die sich nach einigen Minuten auf einen konstanten Wert einpendelte. Diese erhöhte Frequenz war nicht direkt mit einer Kontraktur, die in einigen Präparaten durch Koffein induziert wurde, korreliert und trat auch in Präparaten auf, in denen kein meßbarer Krafttransient nach dem Lösungswechsel zu registrieren war. Die Signale wurden daher erst immer zehn Minuten nach dem Lösungswechsel aufgezeichnet. Die Frequenz, die sich zu diesem Zeitpunkt eingestellt hatte, wurde im allgemeinen über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde aufrechterhalten. Möglicherweise läßt sich die anfänglich erhöhte Frequenz auf eine verstärkte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zurückführen. Versuchsbedingte Ursachen - z. B. geringe Temperaturunterschiede der Versuchslösungen - lassen sich jedoch ebenfalls nicht ausschließen.

In Abb. 3.3 sind im oberen Teil die Frequenzspektren einer inaktiven, ruhenden Faser in Ringer- und einer oszillierenden Faser in 2 mM Koffein-Ringerlösung abgebildet. - Der Begriff Frequenzspektrum wird hier synonym zu Periodogramm benutzt. - Der oszillierenden Faser ist nicht ein einzelnes Frequenzmaximum, sondern ein Bereich, in welchem die Frequenz einen maximalen Wert annimmt, zuzuordnen. Die maximale Frequenz betrug $1,5 - 2,5 \text{ s}^{-1}$. Im Ruhespektrum tritt in diesem Bereich kein Frequenzmaximum auf; dieses Faktum schließt aus, daß Bewegungen, die nicht unmittelbar auf die Sarkomeroszillationen zurückzuführen sind, das Frequenzspektrum der oszillierenden Faser überlagern. Das Ruhespektrum wurde in Richtung der Ordinate um den Faktor 10 gespreizt und zeigt verstärkt bei 21 s^{-1} eine Störung, die im Spektrum der oszillierenden Faser nur schwach zu erkennen ist. Die Ursache dieser Störung konnte nicht eindeutig geklärt werden; sie ist wahrscheinlich auf mechanische Störungen der Apparatur und nicht auf ein höherfrequentes intrinsisches Signal der ruhenden Muskelfaser zurückzuführen.

Zur vollständigen Beschreibung der Beugungsspektren wurden die Intensitätsverteilung des Lichtes zwischen der Linie 0. und 1. Ordnung aufgezeichnet und die Spektren von inaktiven und os-

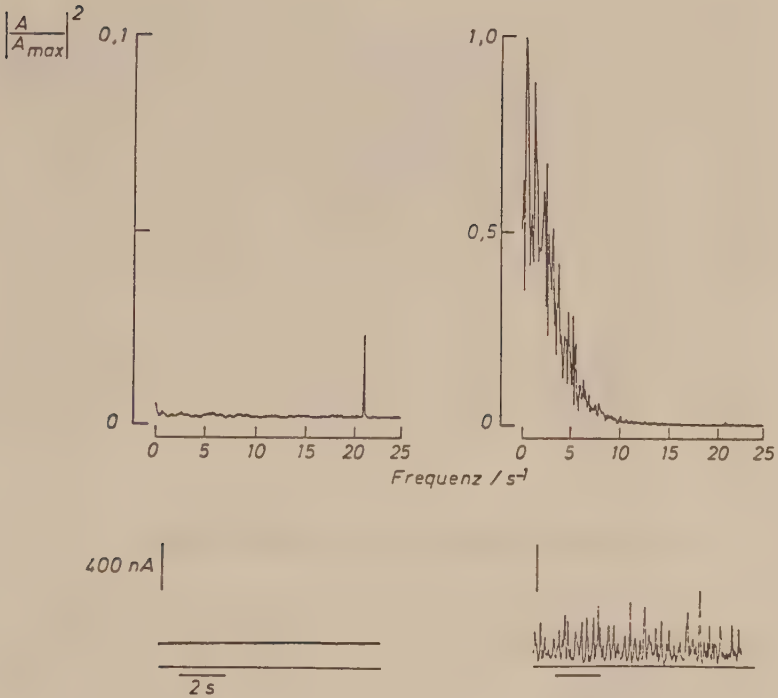


Abb. 3.3

Lichtintensitätsänderungen des 1. Beugungsmaximums und Frequenzspektren einer inaktiven und einer oszillierenden Muskelfaser

- oben: Frequenzspektren einer inaktiven Faser in Ringerlösung (links) und einer oszillierenden Faser in 2 mM Koffein-Ringerlösung (rechts). Die Spektren ergaben sich als Mittelung von 10 Lichtintensitätsspuren à 10 s Dauer. Es wurde jeweils das Quadrat der relativen Amplitude gegen die Frequenz aufgetragen. Das Frequenzspektrum der inaktiven Faser wurde in Richtung der Ordinate um den Faktor 10 gespreizt. Die Abtastrate betrug 100 s⁻¹.
- unten: Dazugehörige Lichtintensitätsspuren einer inaktiven (links) und einer oszillierenden Faser (rechts).

zillierenden Fasern miteinander verglichen. Die Photodiode wurde zur Aufnahme der Spektren parallel zur Faserachse ausgehend von der Linie 0. Ordnung in Richtung des 1. Beugungsmaximums bewegt. Die Gewindestange, an welcher die Photodiode befestigt war, hatte eine Gewindesteilheit von 1 mm pro Umdrehung, so daß sich das Beugungsbild in kleinsten Schritten abtasten ließ. Die Beugungsbilder einer oszillierenden und einer nicht-oszillierenden Faser verliefen bis zum ersten Intensitätsminimum annähernd gleich und differierten in den Abständen von der Linie 0. zur Linie 1. Ordnung (s. Abb. 3.4). Der Abstand nahm in oszillierenden Fasern stets zu; aus der Formel zur Beugung des Lichtes läßt sich somit ableiten, daß die Sarkomerlänge abnahm. Die Werte schwankten zwischen 0,023 und 0,183 μm , was einer prozentualen Abnahme von 0,9 - 7,9 % entspricht.

3.1.3 Die Wirkung Koffein-ähnlicher Methylxanthine

Koffein gehört zur Gruppe der Stickstoff-methylierten Xanthine. Das chemische Grundgerüst dieser Substanzklasse bildet die Purinbase Xanthin (s. Abb. 3.5). Strukturell verwandte Methylxanthine lösen am Herzmuskel des Frosches Koffein-ähnliche Effekte aus, indem sie die Zuckungskraft potenzieren und mit zunehmender Konzentration Kontraktionen auslösen (Chapman & Miller, 1974). Struktur-Aktivitätsvergleiche zeigten, daß nur die Methylxanthine effektiv sind, die nicht in der 9-Position methyliert sind. Chapman und Miller folgerten daraus, daß ein doppelt gebundenes Stickstoffatom im Imidazolring für die Aktivität entscheidend sei. Obwohl die Wirkung von Koffein am Herzen und am Skelettmuskel wahrscheinlich auf unterschiedliche molekulare Mechanismen zurückzuführen ist (Endo, 1977), induzieren auch in der enthäuteten Skelettmuskelfaser nur die Methylxanthine eine Ca^{2+} -Freisetzung, deren Stickstoffatom in der 9-Position keinen Substituenten aufweist (Miller & Thieleczek, 1977).

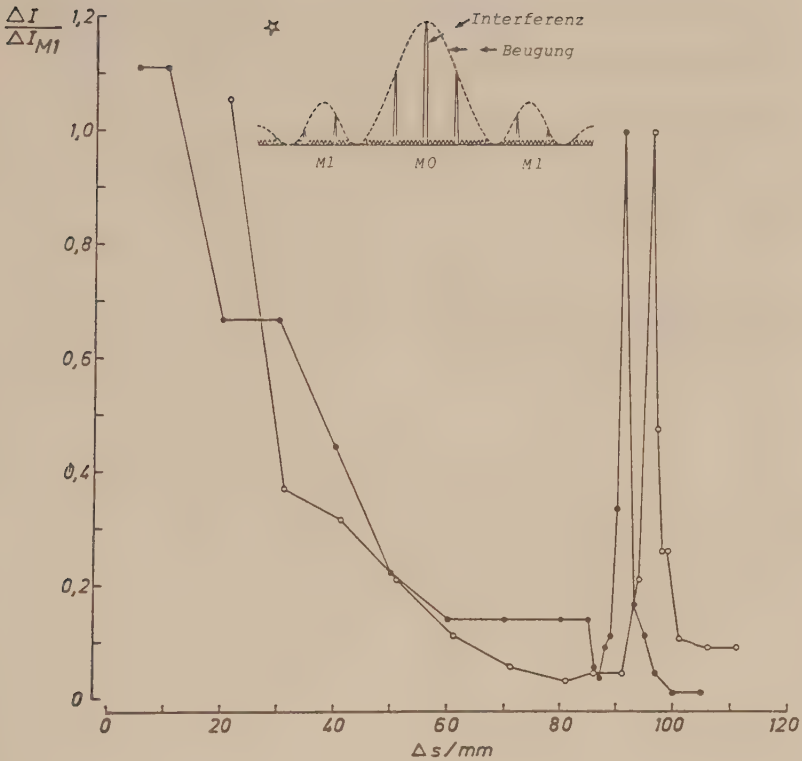


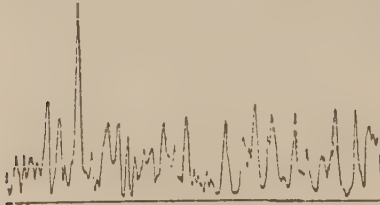
Abb. 3.4

Beugungsspektren einer Muskelfaser im inaktiven und aktivierten - oszillierenden - Zustand

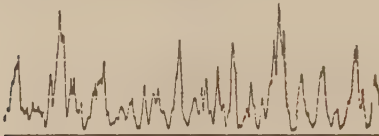
Die Abbildung zeigt die Intensitätsverteilung innerhalb des Beugungsspektrums einer Einzelfaser im inaktiven Zustand in Ringerlösung (●) und oszillierend in 2 mM Koffein-Ringerlösung (○). Das Spektrum wurde zwischen der Linie 0. (M0) und 1. Ordnung (M1) aufgenommen. Die Intensität wurde auf den im 1. Beugungsmaximum gemessenen Wert normiert ($\Delta I_{M1} = 1$) und gegen die Entfernung von der 0-Linie aufgetragen. In $\Delta s = 0$ ist die Linie 0. Ordnung lokalisiert. Die Sarkomerlänge der inaktiven Faser betrug $2,92 \mu\text{m}$, der oszillierenden Faser $2,78 \mu\text{m}$. Das Einsatzbild (s. Stern) zeigt dazu im Vergleich ein Beugungsspektrum, das an einem eindimensionalen Gitter abgeleitet wurde. Es sind die beiden 1. Beugungsmaxima links und rechts der 0-Linie dargestellt.

Ringer 250 nA
1 s

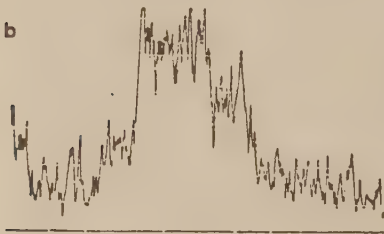
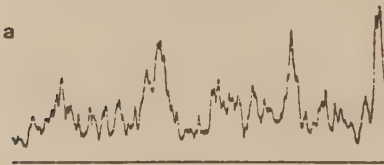
↓ + 2 mM Koffein



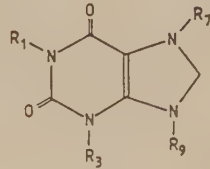
↓ + 0,5 mM 1,7-Dimethylxanthin



↓ + 3 mM 1-Methyl-3-isobutylxanthin



N-Methylierte Xanthine



	R ₁	R ₃	R ₇	R ₉
Koffein	CH ₃	CH ₃	CH ₃	-
1,7-Dimethyl-xanthin	CH ₃	H	CH ₃	-
1,9-Dimethyl-xanthin	CH ₃	H	H	CH ₃
1-Methyl-3-isobutylx.	CH ₃	C ₄ H ₉	H	-

Abb. 3.5

Text s. folgende Seite

Analog zu diesen Ergebnissen zeigt die Abb. 3.5, daß auch nur die Methylxanthine effektiv in der Auslösung von Sarkomeroszillationen waren, die keine Methylgruppe in der 9-Position besaßen. Die Schwellenkonzentrationen variierten zwischen 0,5 und 3 mM, wobei 1,7-Dimethylxanthin (1,7-DMX) die größte Effektivität aufwies. Die Frequenz der von 1,7-DMX induzierten Oszillationen war im Vergleich zu Koffein unverändert, während die Frequenz unter 1-Methyl-3-isobutylxanthin (IBMX) geringfügig abnahm. In diesen Lösungen überlagerte zuweilen eine langsamere Bewegung die schnellen Sarkomeroszillationen (Abb. 3.5: IBMX b)). Die langsame "Welle" trat jedoch nicht regelmäßig auf und war auch nicht mit einem Kraftanstieg korreliert. 1,9-Dimethylxanthin war auch in höheren Konzentrationen - bis zu 4 mM - ineffektiv.

Seit der Entdeckung von Koffein als potentielltem Phosphodiesterasehemmer (Butcher & Sutherland, 1962) wird auch die Wirkung von Methylxanthinen in der Skelettmuskelfaser über die Hemmung der Phosphodiesterase und einen damit verbundenen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration diskutiert. In Übereinstimmung mit Untersuchungen an der enthäuteten Muskelfaser (Thieleczek, 1982) war es nicht möglich, mit cAMP, das als membrangängiges Dibutyryl-cAMP (N^6, O^2 -Dibutyryladenosin-3':5'-phosphat zyklisch-Na-Salz reinst, Serva) eingesetzt wurde, Oszillationen auszulösen. Das Ergebnis bestätigt die Hypothese von Chapman und Miller (1974), daß Methylxanthine wahrscheinlich direkt eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR induzieren und nicht über einen cAMP-abhängigen Mechanismus wirken.

3.1.4 Die Abhängigkeit der Oszillationen von der Sarkomerlänge

Die Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Filamente variiert mit der Sarkomerlänge (s. a. Stephenson & Wendt, 1987). Eine derartige Abhängigkeit der Oszillationen von der Sarkomerlänge war ebenfalls zu beobachten.

Vergleicht man die mittlere Sarkomerlänge einer inaktiven und

einer oszillierenden Faser, so mißt man eine durchschnittliche Abnahme um $0,1 \mu\text{m}$ (s. a. Abb. 3.4). Verändert man in einer oszillierenden Faser die Sarkomerlänge, ist stets eine signifikante Zu- und Abnahme der Frequenz zu beobachten. Abb. 3.6 zeigt die Lichtintensitätssignale und die dazugehörigen Frequenzspektren oszillierender Fasern bei unterschiedlichen Sarkomerlängen. Bis zu einer Sarkomerlänge von durchschnittlich $2,65 \mu\text{m}$ nahm die Frequenz stetig zu, während bei höheren Sarkomerlängen wiederum eine Abnahme der Frequenz zu verzeichnen war (s. a. Abb. 3.7). Bei Sarkomerlängen $\geq 3,6 \mu\text{m}$ unterschied sich das Lichtsignal nicht mehr von dem einer inaktiven Muskelfaser. Die maximalen Frequenzwerte variierten geringfügig von Faser zu Faser; sie lagen im Bereich zwischen $1,1$ und $1,6 \text{ s}^{-1}$.

<u>Sarkomerlänge</u>	<u>f_{max}</u>
<u>μm</u>	<u>s^{-1}</u>
2,55	1,2
2,60	1,5
2,66	1,5
2,67	1,6
2,70	1,1

Tab. 3.1

Maximale Frequenzentwicklung,
gemessen in verschiedenen Muskel-
fasern

Es ist jeweils die Sarkomerlänge
angegeben, bei der die maximale
Frequenz registriert wurde.

Die Ruhelänge einer ungestreckten Muskelfaser beträgt ca. $2,2 \mu\text{m}$ (s. 2.1.1). Auf eine Registrierung von Oszillationen unterhalb dieser Sarkomerlänge wurde verzichtet, da aufgrund der geringen Vorspannung der Präparate die Aufzeichnungen von mechanischen Störungen überlagert wurden.

Eine Längenabhängigkeit wurde auch von Stephenson und Williams (1982) bei myofilamentären Spannungsozillationen beobachtet. Die Oszillationen traten ebenfalls nur im Sarkomerlängenbereich zwischen $2,3$ und $3,1 \mu\text{m}$ auf. Zwei Klassen von Oszillationen ließen sich unterscheiden: bei kleineren Sarkomerlängen eine gedämpfte Schwingung mit relativ hoher Amplitude und kleiner Frequenz und bei größeren Sarkomerlängen eine höher-

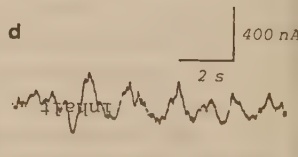
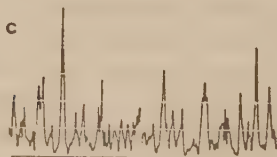
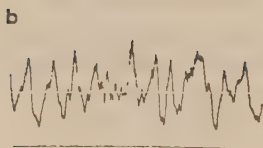
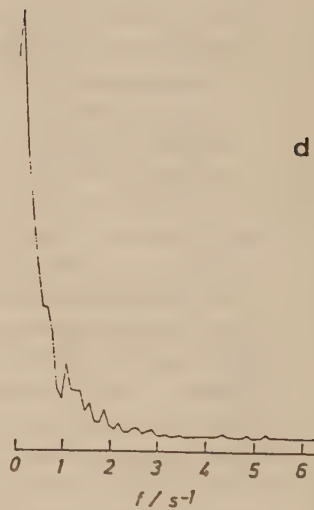
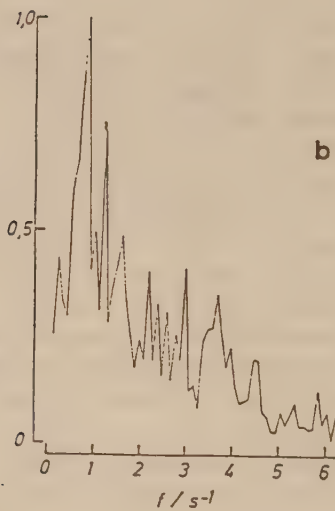
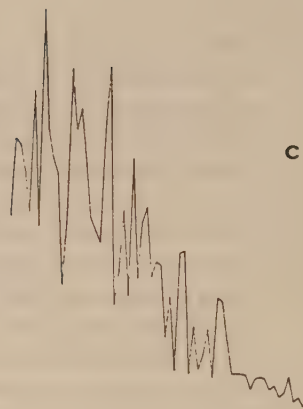
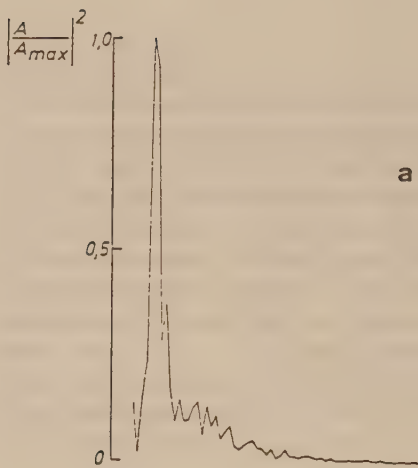


Abb. 3.6
Text s. folgende Seite

Abb. 3.6

Lichtintensitätssignale (unten) und Frequenzspektren (oben) einer oszillierenden Muskelfaser bei unterschiedlichen Sarkomerlängen

a.	Sarkomerlänge = 2,20 μm	Max. Frequenz = 0,5 s^{-1}
b.	2,55	0,8
c.	2,67	1,6
d.	3,37	0,2

Die Frequenzspektren ergaben sich als Mittelung von 8 Lichtintensitätsspuren à 10 s Dauer. Die Abtastrate betrug 100 s^{-1} .

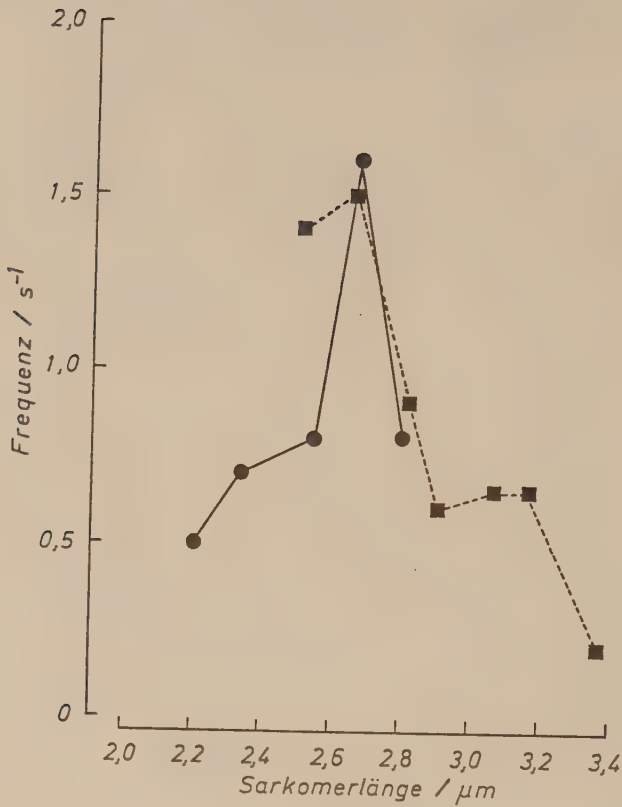


Abb. 3.7

Abhängigkeit der Oszillationen von der Sarkomerlänge

Es wurde jeweils die bei der entsprechenden Sarkomerlänge maximal entwickelte Frequenz aufgetragen. Das Diagramm wurde exemplarisch aus den Aufzeichnungen zweier Versuche zusammengestellt (●, ■).

frequente Schwingung geringer Amplitude, die der gedämpften aufgesetzt war.

Die Zu- und Abnahme der Frequenz in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge erinnert an das Längenspannungsdiagramm einer quergestreiften Muskelfaser. Gordon, Huxley und Julian (1966) beschrieben erstmalig den Verlauf der isometrischen Kraftentwicklung einer einzelnen Muskelfaser in Abhängigkeit von der Sarkomerlänge. Die Kraftentwicklung nimmt bis zu einer Sarkomerlänge von 2,0 μm zu, bleibt zwischen 2,0 und 2,3 μm konstant und nimmt bei höheren Sarkomerlängen wieder ab. Wird die Muskelfaser auf größere Sarkomerlängen als 3,8 μm gestreckt, tritt keine Kraftentwicklung mehr auf. Das Ausbleiben der Kraft wird darauf zurückgeführt, daß sich in Bereichen von mehr als 3,8 μm A- und I-Banden nicht mehr überlappen.

Das hier aufgestellte Diagramm zur Frequenz-Sarkomerlängen-Abhängigkeit ist gegenüber der Längen-Spannungs-Beziehung zu höheren Sarkomerlängen verschoben. Stephenson und Wendt (1987) beobachteten eine ähnliche Verschiebung in enthäuteten Muskelfasern bei unterschwelliger Ca^{2+} -Aktivierung. In diesen unterschwellig aktivierten Präparaten ging ebenfalls die Plateauphase der Längen-Spannungs-Beziehung verloren.

Fabiato und Fabiato (1978b) entwickelten für die oszillatorische Kraftentwicklung folgende Vorstellung: Während der Aktivierung verlieren einige Sarkomere ihre Spannung, da sie entweder inaktiviert oder durch benachbarte oszillierende Sarkomere kurz gedehnt werden. Sie können jedoch wiederum Aktivität aufgrund der streckungsinduzierten Zunahme ihrer Ca^{2+} -Sensitivität entwickeln. Die Abnahme der oszillatorischen Aktivität bei höheren Sarkomerlängen ließe sich damit erklären, daß die Vorspannung aller Sarkomere bereits so hoch ist, daß eine weitere Dehnung ausgeschlossen wird. Umgekehrt ist die Vorspannung in schwach vorgedehnten Präparaten so gering, daß eine passive Dehnung bzw. Aktivierung benachbarter Sarkomere uneffizient bleibt.

3.1.5 Der Einfluß des Membranpotentials

Ein wesentlicher Teil der Untersuchungen dieser Arbeit galt der Frage, inwieweit die oszillatorische Aktivität vom Membranpotential abhängt. Eine derartige Abhängigkeit ist zu erwarten, da die Wirkung von Koffein auf die Kraftentwicklung in niedrigen Konzentrationen potentialabhängig ist (Lüttgau & Oetliker, 1968), während Koffein in höheren Konzentrationen vom Membranpotential unabhängig wirkt und der Angriffspunkt an der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums angenommen wird (s. a. Endo, 1977).

Zu dieser Fragestellung wurden drei verschiedene Versuchsserien durchgeführt:

1. Depolarisation sowohl Koffein- wie auch nicht Koffein-behandelter Fasern bis zur mechanischen Schwelle,
2. Hyperpolarisation oszillierender Fasern,
3. totale Depolarisation oszillierender Fasern.

Die Versuche zu Punkt 1 und 2 wurden an schmalen Muskelstreifen des M. cutaneus pectoris durchgeführt. Die kontraktile Schwelle und die oszillatorische Aktivität wurden optisch bestimmt, ausgewertet wurde jeweils der Faserabschnitt zwischen strominjizierender und potentialmessender Mikroelektrode. Der Abstand der beiden Elektroden betrug maximal 100 μm . Bei den angegebenen Potentialwerten wurde nicht die Längenkonstante der Muskelfasern berücksichtigt, so daß die absoluten Potentialwerte an der Stromelektrode einige Millivolt von den Meßwerten abwichen. Zur Blockierung der Na^+ -Leitfähigkeit enthielten die Lösungen 2×10^{-7} g/ml TTX (Tetrodotoxin, Sigma).

Kumbaraci und Nastuk (1982) depolarisierten in Koffein-behandelten ganzen Muskelpräparaten einzelne Fasern, die trotz der allgemein verwendeten Koffeinkonzentration nicht oszillierten, bis zur kontraktilen Schwelle und konnten so in diesen Fasern Oszillationen induzieren. Die oszillatorische Aktivität wurde umgekehrt durch Hyperpolarisation wieder blockiert. Die Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Oszillationen möglicherweise ein Schwellenphänomen darstellen, welches der vollständigen Aktivierung der Muskelfaser vorausgeht. Die potentialab-

hängige Induktion der Oszillationen im Bereich der Kontraktionsschwelle läßt darauf schließen, daß ein Schritt der elektro-mechanischen Kopplung beeinflußt wird, der morphologisch im Bereich der Triade zwischen T-tubulärer und SR-Membran lokalisiert ist.

Ein solches Schwellenphänomen sollte sich theoretisch auch in nicht Koffein-behandelten Präparaten durch eine Schwellendepolarisation induzieren lassen. Dies konnte experimentell jedoch nicht bestätigt werden. Allein durch unterschwellige Depolarisation der Muskelfasern war es nicht möglich, Sarkomeroszillationen auszulösen (s. Tab. 3.2 o.); dieses Ergebnis wurde auch in einer Versuchsserie bestätigt, in der die Depolarisation nicht durch Strominjektion, sondern durch Lösungen mit einer erhöhten Kaliumkonzentration herbeigeführt wurde. In einigen Fällen ließ sich nicht zwischen einsetzender Kontraktur und beginnender oszillatorischer Bewegung der Sarkomere unterscheiden. Erniedrigte man das eingestellte Potential um wenige Millivolt, waren keine Ansätze oszillatorischer Aktivität mehr zu beobachten.

In Gegenwart niedriger Koffeinkonzentrationen wird die Aktivierungskurve der Skelettmuskelfaser in Richtung auf das Ruhepotential verschoben, d. h. in Anwesenheit von Koffein ist eine geringere Depolarisation der Membran als in "reiner" Rin-gerlösung notwendig, um eine vergleichbare Kraftentwicklung zu induzieren. Kovacs und Szücs (1983) zeigten, daß sich in Koffein-haltigen Lösungen zwar weder die Potentialabhängigkeit noch die Kinetik intramembranaler Ladungsverschiebungen verändert, daß jedoch die Menge der Ladungen, die zur Auslösung einer Schwellenkontraktion notwendig ist, reduziert ist. Die Autoren interpretierten die Wirkung von Koffein dahingehend, daß der potentialabhängige Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus empfindlicher reagiert. Um diese Potentialabhängigkeit der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung im Bereich der mechanischen Schwelle erneut auch im Hinblick auf die Sarkomeroszillationen zu überprüfen, wurde die Koffeinkonzentration der Lösungen soweit

Lösung	Ruhe- potential	Depolarisation/ Hyperpolaris.	Oszillationen
	mV	mV	
Ringer	-87,5	-50,0	-
	-91,0	-64,0	-
		-57,0	?
	-83,5	-59,0	-
	-82,0	-63,0	-
	-92,0	-70,0	-
Ringer	-78,0	-58,0	-
+ 1 mM	-81,0	-62,0	?
Koffein	-90,0	-64,0	-
	-84,0	-64,0	-
	-86,0	-66,0	-
	-90,0	-68,0	-
	-81,0	-68,0	?
	-88,3	-71,2	-
		-68,3	?
Ringer	-72,9	- 92,0	+
+ 2 mM		-130,1	-
Koffein	-86,0	- 98,9	+
		-104,2	+
		-110,3	+
		-116,8	+
		-120,0	+
		-129,9	+
	-88,2	-105,8	+
		-120,0	+
		-123,0	+
	-76,0	- 88,9	+
		- 96,2	+
		-105,4	+
		-120,8	-
	-61,5	-103,0	+
		-110,3	+
		-118,0	+
	-72,0	- 95,0	-
		-113,0	-
	-85,2	- 97,3	+
		-111,3	+
	-78,0	- 96,0	+
		-110,0	+
	-63,0	- 82,1	+
		-100,2	+
		-109,4	+
	-88,0	- 97,3	+
		-110,3	+
		-103,4	+

Tab. 3.2

Text s. folgende Seite

Tab. 3.2

Unterschwellige Depolarisation und Hyperpolarisation einzelner Muskelfasern

- oben: Einzelne Muskelfasern wurden mittels Strominjektion bis zur mechanischen Schwelle depolarisiert. Die kontraktile Schwelle und das Einsetzen der Oszillationen wurden optisch über ein Stereomikroskop mit einem "long distance"-Objektiv (50x/N.A.=0,60; Leitz) bestimmt. Die Fragezeichen in der Tabelle weisen darauf hin, daß es in diesen Fällen nicht möglich war, zwischen einer einsetzenden Kontraktur und beginnender oszillatorischer Aktivität zu unterscheiden. Wenige Millivolt unter dem angegebenen Potentialwert waren keine Ansätze oszillatorischer Aktivität zu erkennen.
- unten: Oszillierende Muskelfasern wurden mittels Strominjektion auf die angegebenen Potentialwerte hyperpolarisiert. Die oszillatorische Aktivität wurde wie oben optisch kontrolliert. Das Minuszeichen in der Tabelle zeigt an, daß in diesen Fällen die Oszillationen gestoppt wurden.

reduziert (1 - 1,5 mM), daß sie nicht zur Auslösung von Oszillationen ausreichte. Die Präparate wurden über die Strominjektion oder depolarisierende K^+ -Lösungen unerschwellig depolarisiert. Wie schon in nicht Koffein-behandelten Präparaten ließ sich auch in diesem Falle keine Potentialabhängigkeit der Auslösung von Oszillationen feststellen. Auch in depolarisierten Fasern - die eingestellten Potentiale eines Versuchs sind in Tab. 3.2 o. zusammengestellt - war stets die übliche Koffeinkonzentration von 2 mM zur Auslösung der Oszillationen notwendig.

In einer weiteren Versuchsserie wurden oszillierende Fasern hyperpolarisiert bzw. durch Einstellung auf Potentialwerte von ± 0 mV völlig inaktiviert.

In Gegenwart von Koffein werden Teile des kontraktile Systems schon wenige Millivolt über dem Ruhepotential aktiviert. Die oszillatorische Aktivität ließe sich somit eventuell auf eine partielle unerschwellige Aktivierung der Muskelfaser zurückführen. Bei einer Hyperpolarisation der Fasermembran auf Werte ≤ -100 mV befindet sich sowohl das kontraktile System wie auch der Komplex der intramembranaln Ladungsträger im Ruhezustand, so daß in diesem Potentialbereich keine Sarkomeroszillationen mehr auftreten sollten.

Einzelne oszillierende Muskelfasern wurden bis auf Potentialwerte von -130 mV hyperpolarisiert. Bis auf wenige Ausnahmen blieb die oszillatorische Aktivität unbeeinflusst; es war weder eine Änderung der Frequenz noch der Amplitude zu verzeichnen (s. a. Tab. 3.2 u.).

Das kontraktile System der Skelettmuskelfaser befindet sich bei Membranpotentialen ≥ -20 mV im Zustand der vollständigen Inaktivierung, d. h. in diesem Potentialbereich läßt sich keine Kontraktur mehr auslösen (vergl. Hodgkin & Horowicz, 1960; Lüttgau & Spiecker, 1979). Die Muskeln wurden mit einer 190 mM K^+ -haltigen Ringerlösung (190K) auf Werte zwischen -8,8 und +19,4 mV depolarisiert. Die Muskelfasern wurden von einer Koffein-Ringerlösung unmittelbar in die 190K-Lösung, die zu-

sätzlich 2 mM Koffein enthielt, überführt. Nach einer mit dem Lösungswechsel auftretenden Kontraktur waren unverändert weiterhin Oszillationen zu registrieren. Es trat lediglich ein zeitabhängiger Effekt auf, der in Abb. 3.8 dargestellt ist. Nach 30- bis 40minütiger Inkubationszeit war das Frequenzmaximum deutlich zu kleineren Werten verschoben, und im Verhältnis dazu fiel der höher-frequente Anteil der Oszillationen weg. Das Frequenzverhalten unterschied sich unmittelbar nach dem Wechsel zur hoch Kalium-haltigen Lösung nicht signifikant von dem in 2 mM Koffein-haltiger Referenzlösung (s. Abb. 3.8).

Die Versuchsergebnisse weisen deutlich auf eine vom Membranpotential unabhängige, unterschwellige Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und eine damit verbundene Aktivierung des kontraktile Apparates hin. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kumbaraci und Nastuk (1982) unterstützen sie stärker die von Allen und Mitarbeitern (1984) aufgestellte Hypothese, welche die oszillatorische Aktivität auf eine zyklische, potentialunabhängige Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR zurückführt.

3.1.6 Die Wirkung von Pharmaka, welche die Ca^{2+} -Freisetzung modifizieren

Wie im letzten Abschnitt gezeigt werden konnte, treten die Sarkomeroszillationen offensichtlich potentialunabhängig auf; d. h. die oszillatorische Aktivität wird wahrscheinlich von einem Mechanismus gesteuert, der entweder in der Kopplungsstruktur zwischen T-tubulärem System und sarkoplasmatischem Retikulum oder weiter intrazellulär lokalisiert ist. Als Ergänzung zu den im letzten Kapitel beschriebenen Versuchen wurden verschiedene Pharmaka getestet, die in unterschiedliche Schritte der potential- und Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung eingreifen: der Ca^{2+} -Antagonist D-600, das Muskelrelaxans Dantrolen und das (neutrale) Alkaloid Ryanodin (s. Abb. 3.9).

Die Wirkung von D-600 als Ca^{2+} -Antagonist ist aus dem Bereich

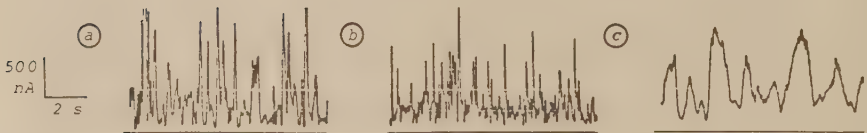
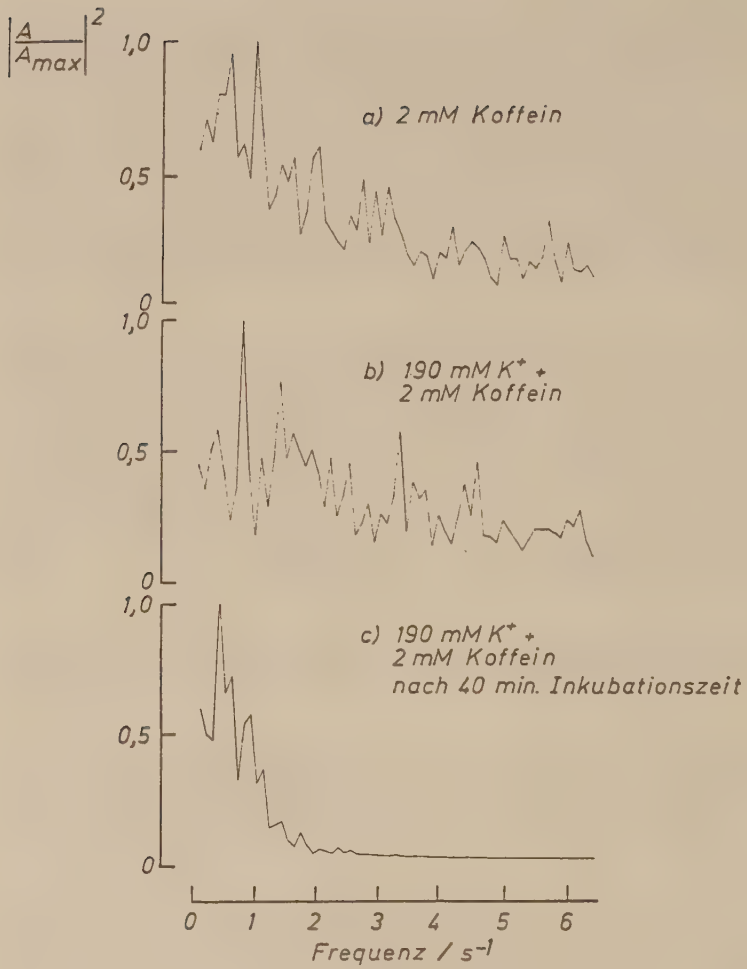


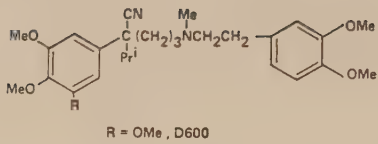
Abb. 3.8

Text s. folgende Seite

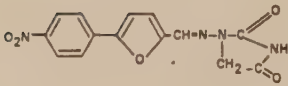
Abb. 3.8

Sarkomeroszillationen in vollständig depolarisierten Fasern

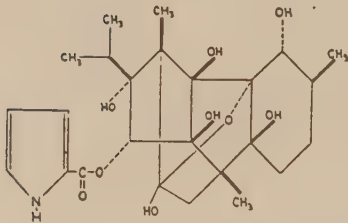
Lichtsignale (unten) und Frequenzspektren (oben) einer oszillierenden Muskelfaser in 2 mM Koffein-Ringer- bzw. hoch K^+ -haltiger (190 mM K^+) Koffeinlösung. Die Frequenzspektren ergaben sich als Mittelung von 10 Lichtintensitätsspuren à 10 s Dauer, die Abtastrate betrug 100 s^{-1} .



D-600



Dantrolen



Ryanodin

Abb. 3.9

Strukturformeln von D-600, Dantrolen und Ryanodin

der Herzphysiologie seit langem bekannt. Fleckenstein und Mitarbeiter (1971, 1977) konnten eine selektive Blockierung des langsamen Ca^{2+} -Einwärtsstroms des Herzaktionspotentials durch D-600 und verwandte Ca^{2+} -Antagonisten nachweisen. Nach Eisenberg, McCarthy und Milton (1983) existiert im Skelettmuskel eine weitere Bindungsstelle für D-600 in der Kopplungsstruktur zwischen T-tubulärer und SR-Membran. Bei niedrigen Temperaturen ($\leq 4^\circ\text{C}$) wird ein in D-600 inkubiertes Präparat durch Depolarisation auf 0 mV in den Zustand der "Paralyse" überführt. Im paralyisierten Zustand ist es nicht möglich, unmittelbar durch eine nochmalige Depolarisation vom Ruhepotential aus eine weitere Kontraktur auszulösen. Diese Entkopplung von T-System und SR-Membran läßt sich durch einen Hyperpolarisationsschritt aufheben (Berwe, Gottschalk & Lüttgau, 1987). Die Autoren erklären diesen Befund mit einer potentialabhängigen Bindung des Pharmakons an einen Potentialsensor in der T-tubulären Membran, der über einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR steuert. Unbeeinflusst davon bleibt jedoch die Koffein-induzierte Freisetzung. In Anlehnung an die Versuche von Eisenberg et al. (1983) wurden die Versuche nach folgendem Schema durchgeführt (s. a. Abb. 3.10):

(1)	(2)	(3)
Oszillationstest	--> Ringer	--> 20 - 30 min Ringer + D-600
(4)	(5)	(6)
--> 190K + D-600	--> Ringer(D-600)	--> 190K(D-600)
(7)	(8)	
--> Ringer(D-600)	--> Ringer(D-600) + 2 mM Koffein	
(9)	(10)	
--> Ringer(D-600)	--> 190K(D-600)	

Da die paralyisierende Wirkung nur bei tiefen Temperaturen auftritt, wurde die Versuchstemperatur auf 4°C eingestellt.

Nach einem vorangestellten Oszillationstest (Überprüfung der oszillatorischen Aktivität in 2 mM Koffein-Ringerlösung) und

kurzzeitiger Ruhephase in Ringerlösung wurde die Muskelfaser 20 - 30 Minuten in D-600 inkubiert. Nach einer vollständigen Depolarisation der Faser (4) sollte keine weitere Kontraktion mehr auslösbar sein. War danach noch eine meßbare Kraftentwicklung zu verzeichnen (6), wurde dieser Schritt wiederholt. Befand sich das Präparat in Paralyse, wurde die oszillatorische Aktivität erneut getestet. D-600 wurde in Konzentrationen bis zu 30 μM eingesetzt. Um eine Dissoziation des Moleküls zu vermeiden, wurde D-600 allen Testlösungen zugesetzt. In fünf von sechs Fällen ließen sich mit der üblichen Koffeinkonzentration wiederum Oszillationen auslösen; ebenso war keine Änderung der Frequenz zu verzeichnen. Es wurden nur die Versuche ausgewertet, bei denen sich die Präparate zum Abschluß der Versuche noch in Paralyse befanden.

Dagegen wirkten Substanzen, von denen ein intrazellulärer Wirkort angenommen wird, blockierend auf die Oszillationen. Dantrolen (1-(5-(p-Nitrophenyl)-furfuryliden-amino)-hydantoin-Natriumsalz, Röhm-Pharma; s. Abb. 3.9) wird klinisch allgemein als Muskelrelaxans eingesetzt. Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre (erste Daten von Ellis & Bryant, 1972) haben gezeigt, daß Dantrolen nicht die elektrischen Eigenschaften der äußeren Membran verändert. Desmedt und Hainaut (1979) führen die relaxierende Wirkung auf eine Entkopplung von T-System und SR-Membran und eine Reduktion der Ca^{2+} -Freisetzungsstellen an der SR-Membran zurück. Danko, Kim, Sreter und Ikemoto (1985) demonstrierten an isolierten SR-Vesikeln, daß die Koffein-induzierte und spontane Ca^{2+} -Freisetzung von Dantrolen gehemmt wird. Die Ergebnisse für den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -release waren nicht eindeutig.

Dantrolen wurde in einer Konzentration von 12 μM , welche an der Löslichkeitsgrenze lag, eingesetzt. Da Dantrolen in Lösung nur maximal 6 Stunden haltbar ist (Angabe des Herstellers), wurden die Lösungen stets vor jedem Versuch neu angesetzt. Nach einem vorangestellten Oszillationstest wurden die Präparate 40 Minuten lang in Dantrolen inkubiert. Im Anschluß war es nicht mehr möglich, mit der üblichen Koffeinkonzentration

Oszillationen zu induzieren. Erhöhte man entweder die Koffeinkonzentration auf 4 mM oder die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 auf 10 mM, wurde die Hemmung aufgehoben. Mit dem Lösungswechsel traten wiederum Oszillationen unveränderter Frequenz und Amplitude auf. Setzte man Dantrolen der Badlösung oszillierender Fasern zu, so trat die Hemmung mit einer gewissen Latenzzeit ein. Nach 15 Minuten war eine erste Abnahme der Frequenz zu verzeichnen, die sich in den folgenden 15 Min. verstärkte. Nach insgesamt 45 Min. war die oszillatorische Aktivität erloschen.

Dieselbe hemmende Wirkung auf die Oszillationen zeigte Ryanodin. Ryanodin ($\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_9$, K & K Chemicals) ist ein nicht-basisches Alkaloid (s. Abb. 3.9), das erstmalig aus Stamm und Wurzel von Ryania speciosa (Vahl) isoliert wurde. Skelettmuskelfasern von Vertebraten entwickeln in Gegenwart von Ryanodin ohne Depolarisation der Zellmembran irreversible Kontrakturen, denen eine Latenzzeit von 20 - 30 Minuten vorausgeht. Veränderungen der elektrischen Parameter der Membran konnten nicht nachgewiesen werden. Bianchi (1968) führt die Wirkung von Ryanodin auf eine Hemmung der Ca^{2+} -Aufnahme ins SR zurück, was von Noireaud und Léoty (1984) ebenfalls in Untersuchungen am Säugerskelettmuskel bestätigt wurde. Nach 30-minütiger Inkubationszeit des Präparates in 2 μM Ryanodin ließen sich keine Oszillationen mehr auslösen. Diese Hemmung konnte weder durch eine Erhöhung der Koffein- noch der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aufgehoben werden. Wurde Ryanodin der Oszillationslösung hinzugegeben, trat die maximal hemmende Wirkung nach einer Latenzzeit von 40 Minuten auf. In den ersten 10 Minuten nach der Zugabe ließ sich zunächst keine Veränderung der Oszillationen beobachten. Eine erste Abnahme der Frequenz war nach 15 Minuten zu verzeichnen, nach weiteren 25 Minuten trat eine vollständige Hemmung der oszillatorischen Aktivität ein. Das Versuchsergebnis geht konform mit den Befunden von Allen et al. (1984) und Lakatta, Capogrossi, Kört und Stern (1985). Beide Forschergruppen wiesen eine Blockierung von Ca^{2+} -Oszillationen in Herzmuskelzellen durch Ryanodin nach. Interessant

ist in diesem Zusammenhang die Parallelität zur Wirkung von höheren Koffeinkonzentrationen (10 - 20 mM), von denen auch im Skelettmuskel eine Hemmung der Ca^{2+} -Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum angenommen wird.

3.1.7 Die potenzierende Wirkung von Lidocain auf die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung

Lidocain (2-Diethylamino-N-(2,6-dimethylphenyl)acetamid, Sigma; s. Abb. 3.11) gehört zur Gruppe der Lokalanästhetika und ist strukturell mit Tetracain und Procain verwandt. Während diese beiden Substanzen als Antagonisten zu Koffein wirken, verstärkt Lidocain Koffein-induzierte Kontraktionen (Bianchi, 1968). Die Wirkung von Lidocain ist streng vom pH-Wert abhängig. Lidocain besitzt einen pK-Wert von 7,85 und liegt bei pH 7,2 zu ca. 80 % in der geladenen Form (RH^+) vor. Mit steigendem pH-Wert nimmt der prozentuale Anteil der freien Base (R) und die Permeabilität der Substanz zu. Damit verbunden wird die Effektivität von Lidocain verstärkt, d. h. geringere Konzentrationen reichen für die Auslösung eines vergleichbaren Effekts aus.

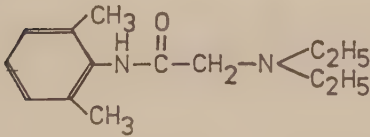


Abb. 3.11

Strukturformel von Lidocain

Lidocain allein war in Konzentrationen bis zu 10 mM ineffektiv. Es waren weder Anzeichen oszillatorischer Aktivität zu erkennen noch war eine Kraftentwicklung zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu konnte die Schwellenkonzentration von Koffein zur Auslösung der Oszillationen auf 1,5 mM gesenkt werden. Stets war eine leichte Zunahme der Frequenz zu beobachten (s. Abb. 3.12).

Für Lidocain werden zwei verschiedene Bindungsstellen, an der äußeren Zellmembran und an der SR-Membran, angenommen (vgl.

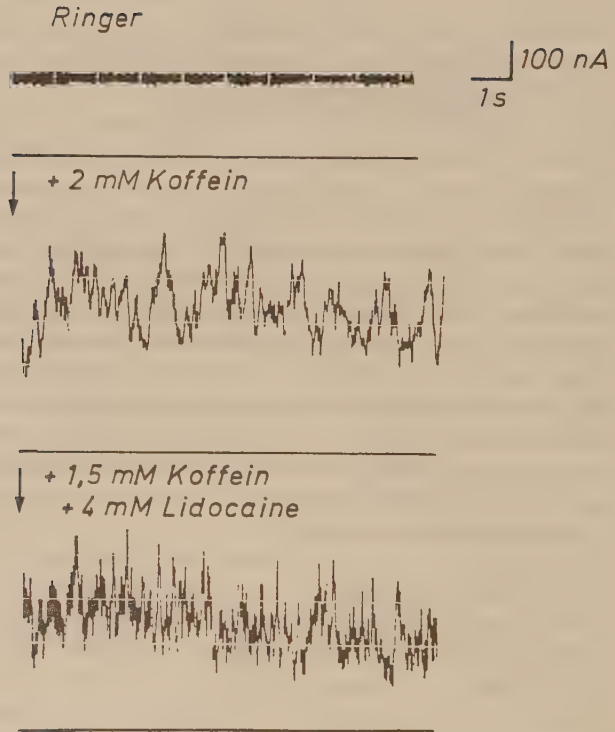


Abb. 3.12

Die potenzierende Wirkung von Lidocain auf die Koffein-induzierten Sarkomeroszillationen

Lichtsignale einer ruhenden Muskelfaser in Ringerlösung (oben) und derselben Faser, oszillierend, in 2 mM Koffein-Ringerlösung (Mitte) bzw. in einer Lidocain-haltigen Lösung (1,5 mM Koffein + 4 mM Lidocain, unten). Die Faser wurde nacheinander in Ringerlösung, 2 mM Koffein-Ringerlösung, Ringerlösung und anschließend in die Lidocain-haltige Lösung (s. o.) überführt.

Wali, 1986). Die Blockierung des Aktionspotentials durch Lidocain wird auf die Bindung des Moleküls an der T-tubulären Membran, die Potenzierung Koffein-induzierter Kontrakturen auf eine direkte Wirkung auf die SR-Membranen zurückgeführt (Bianchi, 1968). Für eine direkte Bindung an die SR-Membran spricht auch der Befund, daß die Effektivität von Lidocain steigt, wenn der Anteil der freien Base bei steigendem pH-Wert und damit die Membranpermeabilität des Moleküls zunimmt. Die potenzierende Wirkung von Lidocain auf die Koffein-induzierten Sarkomeroszillationen legen einen ähnlichen Mechanismus nahe. Da ein Einfluß des Membranpotentials nahezu ausgeschlossen werden kann, ist auch hier eine Bindung von Lidocain an Strukturen der äußeren Zellmembran und innerhalb des T-tubulären Systems unwahrscheinlich. Die Verstärkung von Koffeinkontrakturen war nicht von einer Zunahme der Ca^{2+} -Aufnahme ins SR begleitet (Bianchi, 1968). Das Ergebnis weist auf eine direkte Beeinflussung des Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus an den Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Retikulums durch Lidocain hin.

3.1.8 Der Einfluß der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Eine neue Gruppe von Ca^{2+} -Indikatoren leitet sich von dem seit langem bekannten Ca^{2+} -Chelator EGTA ab. Sie zeichnen sich durch eine hohe Affinität für Ca^{2+} , eins-zu-eins-Stöchiometrie für Calciumionen und eine vernachlässigbar geringe Bindung an Membranen aus (Tsien, 1983). Der große Vorteil der neuen Indikatoren besteht darin, daß sie auch in einer membranpermeablen Form existieren und nicht mehr in die Zelle injiziert werden müssen. Die vier hydrophilen Carboxylgruppen, welche die Moleküle membranimpermeabel machen, sind mit Acetomethylgruppen verestert, die die Chelatoren in eine hydrophobe, membranpermeable Form überführen (s. a. Abb. 3.13). In der Zelle werden diese Gruppen durch zytoplasmatische Esterasen hydrolysiert, welche die Ester in die ursprüngliche hydrophile Ca^{2+} -bindende Form überführen. Aufgrund der hohen Absorptions- bzw.

Fluoreszenzänderungen bei der Bindung von Calciumionen an das Molekül werden Substanzen dieser Gruppe vielfach zur quantitativen Bestimmung der freien zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration eingesetzt. In den hier vorgestellten Experimenten sollte die hohe Affinität der Indikatoren für Calcium ausgenutzt werden, das freie zytoplasmatische Ca^{2+} - in Ruhe und während einer Aktivierung - hinreichend tief ($\leq 10^{-8}$ M) abzupuffern.

Als Ca^{2+} -Chelator wurde BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure; Abb. 3.13) eingesetzt, das von der Firma "Molecular Probes" als Acetoxymethylester angeboten wird.

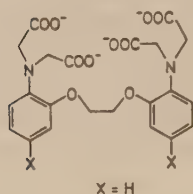


Abb. 3.13

Strukturformel von BAPTA

Die Präparate wurden 1 bis 1,5 Stunden lang in Ringerlösung, die 150 μM BAPTA enthielt, inkubiert. Die Inkubationszeit ist im Verhältnis zu Versuchen mit anderen Präparaten - roten Blutzellen, Lymphozyten - sehr lang; es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Esteraseaktivität im Skelettmuskel nach Angaben von Tsien (1983) sehr gering ist. Die Präparate wurden anschließend wieder in Ringerlösung ohne BAPTA überführt, und die Koffeinkonzentration zur Auslösung von Oszillationen wurde überprüft. Die Schwellenkonzentration verschob sich deutlich zu niedrigeren Werten. Oszillationen wurden schon von einer Koffeinkonzentration von 1 mM induziert, die Frequenz war deutlich niedriger als vor der BAPTA-Inkubation. In Gegenwart von 1 mM Koffein war die Bewegung sehr unregelmäßig, mit zunehmender Koffeinkonzentration wurde diese periodischer (s. Abb. 3.14). Wurde die übliche Koffeinkonzentration von 2 mM eingesetzt, waren in den ersten Sekunden nach dem Lösungswechsel zunächst Sarkomeroszillationen mit der üblichen Frequenz

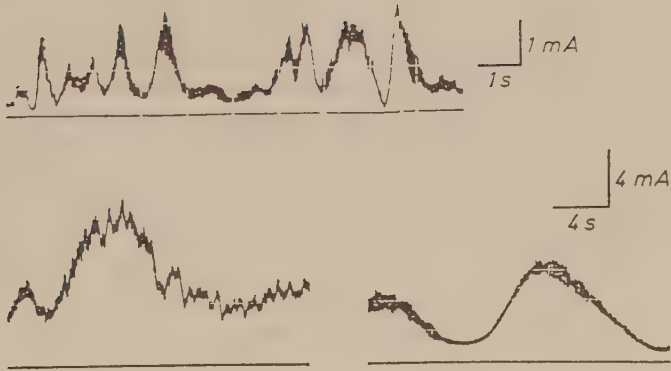


Abb. 3.14

Der Einfluß der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration auf die oszillatorische Aktivität

Koffein-induzierte Sarkomeroszillationen in Gegenwart des Ca^{2+} -Chelators BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure). Die Präparate wurden 1 bis 1,5 Stunden lang in 150 μM BAPTA-Ringerlösung inkubiert. Die höher frequente oszillatorische Bewegung (oben) wurde zuweilen von einer langsameren Schwingung (unten) überlagert. Die eingesetzte Koffeinkonzentration betrug 1,5 mM.

zwischen 1 und 2 s^{-1} zu beobachten, die sich wieder rasch zu langsameren "Wellen" entwickelten. In Ca^{2+} -freier Lösung (s. Tab. 2.1) ließ sich das Phänomen in ähnlicher Weise reproduzieren, wobei im Gegensatz zu Ca^{2+} -haltigen Lösungen die Oszillationen oft nur über einen sehr kurzen Zeitraum ($\leq 10\text{ min}$) registriert werden konnten.

Die Dissoziationskonstante von BAPTA für Ca^{2+} beträgt 107 mM (Tsien, 1980). Offensichtlich reicht die Affinität für Ca^{2+} jedoch nicht aus, um das gesamte, während einer - in diesem Falle unterschwelligen - Aktivierung aus dem SR freigesetzte Ca^{2+} abzupuffern. Verändert wird lediglich die Kinetik der Freisetzung, die sich in einer Abnahme der Frequenz der Oszillationen äußert. Indirekt sind diese Versuche ein Indiz dafür, daß intrazelluläre Ca^{2+} -Fluktuationen den optisch sichtbaren Oszillationen zugrundeliegen. Es bleibt die Frage offen, ob diese Ca^{2+} -Fluktuationen über der SR-Membran erfolgen, d. h. daß es sich folglich um eine zyklische Freisetzung und Aufnahme von Ca^{2+} aus dem bzw. ins SR handelt, oder ob sie unabhängig vom SR von den Myofilamenten gesteuert werden.

3.2 Ca²⁺- und Koffein-induzierte Oszillationen in der enthäuteten Skelettmuskelfaser

Insbesondere zwei Befunde aus den vorab vorgestellten Versuchsergebnissen weisen darauf hin, daß der Wirkungsmechanismus, welcher der oszillatorischen Aktivität der Skelettmuskelfaser zugrundeliegt, intrazellulär, d. h. im myofilamentären Raum oder am sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist:

1. Die oszillatorische Aktivität ist unabhängig vom Membranpotential. Oszillationen konnten weder, wie von Kumbaraci und Nastuk (1982) beschrieben, durch Depolarisation der Fasermembran bis zur mechanischen Schwelle induziert noch durch Hyperpolarisation ausgelöscht werden. Sogar in völlig depolarisierten Fasern ließen sich mit der allgemein verwendeten Koffeinkonzentration (2 mM) wiederum Oszillationen auslösen.
2. Pharmaka, die in Teilschritte der elektro-mechanischen Kopplung eingreifen (z. B. D-600), hatten keinen Einfluß auf die oszillatorische Aktivität. Dagegen blieben in Gegenwart von Substanzen, von denen ein intrazellulärer Wirkort angenommen wird (z. B. Dantrolen und Ryanodin), die Oszillationen aus.

Aus Untersuchungen an der enthäuteten Skelettmuskelfaser sind sowohl myofilamentäre wie auch durch zyklische Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR induzierte Spannungsoszillationen bekannt. Eine gezielte, getrennte Beeinflussung dieser beiden Strukturen ist in der intakten Skelettmuskelfaser sehr schwierig, wenn nicht unmöglich. Es schien daher interessant, die Versuche an einem Präparat fortzuführen, das eine weitgehende Beeinflussung des intrazellulären Milieus zuläßt. Ein Präparat, das sich für derartige Experimente anbietet, ist die "enthäutete" Muskelfaser.

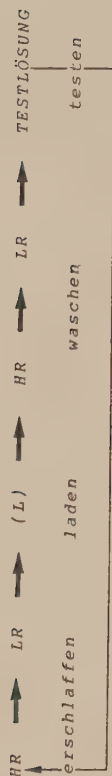
Die mechanische bzw. chemische Zerstörung der Oberflächenmembran der Muskelfaser erlaubt einen direkten Zugang zum Intrazellulärraum und läßt die Struktur des kontraktiles Apparates

relativ unverändert. Es existieren heute grundsätzlich drei verschiedene Verfahren zur Enthäutung von Muskelpräparaten:

1. Natori (1954) entwickelte als erster eine Methode zur mechanischen Enthäutung von Skelettmuskelfasern, bei der in einer Mikrosezierung das Sarkolemma mit Hilfe feiner Nadeln und Pinzetten abgestreift wird.
2. Fabiato und Fabiato (1973) entwickelten ein analoges Verfahren für Herzmuskelzellen, wobei die Zellmembran durch eine Homogenisation der Präparate zerstört wird.
3. Bei einer chemischen Enthäutung wird die Plasmamembran der Präparate durch eine Detergenzienbehandlung hoch permeabel gemacht (vergl. Saponinbehandlung nach Endo & Iino, 1980).

Der Zustand der inneren Membransysteme hängt von der Methode der Enthäutung ab. Insbesondere bei der chemischen Enthäutung besteht die Gefahr, daß ebenfalls die Membranen intrazellulärer Systeme angegriffen werden. Die Enthäutung der für die folgenden Versuche verwendeten Präparate erfolgte nach der Methode von Moisescu und Thieleczek (1978), welche in Anlehnung an das Verfahren von Natori (1954) entwickelt wurde. Die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums bleiben dabei weitgehend unversehrt, während sich die rudimentären T-tubulären Membranen nach der Enthäutung wahrscheinlich zu Vesikeln verschließen.

Die folgenden Versuche zeigen einige Bedingungen auf, unter denen sich in der enthäuteten Faser sowohl Spannungssoszillationen, d. h. Oszillationen der isometrischen Kraftentwicklung, als auch unterschwellige Sarkomeroszillationen induzieren lassen. - An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß der Begriff "Spannung" nicht mit elektrischer Membranspannung gleichzusetzen ist, sondern synonym zu "isometrischer Kraftentwicklung" verwendet wird. - Der generelle Versuchsablauf ist Abb. 3.15 zu entnehmen. Die Versuchsergebnisse lassen darauf schließen, daß die Sarkomeroszillationen ein Schwellenphänomen in der Aktivierung der Skelettmuskelfaser darstellen, welches durch eine zyklische Aktivität des SR's gesteuert wird.



	30 s	≤ 2 min	60 s	30 s	Zeit in der Lösung
> 10	> 8	6,1 o. 7,0	> 10	> 8	pCa

Abb. 3.15

Genereller Versuchsablauf in Experimenten mit entthäteten Muskelfaserpräparaten

Die Präparate wurden nacheinander in die angegebenen Badlösungen überführt. Die Erschlaffungs-
lösung HR besaß eine hohe Pufferung für Ca^{2+} mit 50 mM EGTA, während die intermediäre Lösung
LR niedrig mit 0,1 mM EGTA gepuffert war. Der Ladungsschritt wurde in einigen Versuchen ausge-
lassen. Die freie Ca^{2+} -Konzentration der Ladungslösung L betrug in Gegenwart einer niedrigen
freien Mg^{2+} -Konzentration (0,1 mM) 10^{-7} M, bei einer höheren freien Mg^{2+} -Konzentration (1 mM)
 8×10^{-7} M. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Badlösungen ist Kap. 2.1.2.2 zu ent-
nehmen.

3.2.1 Koffein-induzierte Spannungsozillationen in Abhängigkeit von der freien Ca^{2+} -Konzentration

Repetitive Kontraktionen der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Gegenwart von Koffein wurden erstmalig von den Arbeitsgruppen Ebashi et al. (1969) und Endo et al. (1970) beschrieben. Sie werden wahrscheinlich durch eine zyklische Aufnahme und Abgabe von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verursacht (Endo et al., 1970). Im Bereich von 0,2 bis 1 mM Koffein bei einer berechneten freien Ca^{2+} -Konzentration von 5×10^{-7} M nahm die Frequenz der Oszillationen mit steigender Koffeinkonzentration zu. Wurde die Koffeinkonzentration auf 5 mM erhöht, folgte auf einen plötzlichen Spannungsanstieg eine langsame Rückkehrphase mit kleinen aufgesetzten Spannungsozillationen. Bei einer Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration bis zur Kontraktionsschwelle (10^{-6} M) traten auch ohne Koffein in der Badlösung spontane Oszillationen auf.

In Anlehnung an die Versuche an der intakten Muskelfaser wurden die ersten Experimente unter Versuchsbedingungen durchgeführt, unter denen die oszillatorische Aktivität der intakten Muskelfaser maximal war: Die Versuchstemperatur lag zwischen 9 und 12 °C, das Präparat wurde auf eine Sarkomerlänge von ca. 2,6 μm gestreckt, und die Koffeinkonzentration betrug 2 mM.

In nominell Ca^{2+} -freien Lösungen ($\text{pCa} \geq 8,0$) folgte auf einen Lösungswechsel zu einer Freisetzungslösung mit 2 mM Koffein (EGTA = 0,1 mM) eine einzelne transiente Kontraktion, der über einen Zeitraum von mehreren Minuten keine weiteren folgten. Wurde die freie Ca^{2+} -Konzentration auf 10^{-6} M erhöht, traten unter sonst unveränderten Versuchsbedingungen nach einer kurzen Latenzzeit Spannungsozillationen auf, die oft über einen Zeitraum von mehr als 60 Minuten zu beobachten waren (s. Abb. 3.16). Die Kontraktionen wiesen alle eine schnelle Anstiegsphase und im Verhältnis langsamere Rückkehrphase auf. $T_{1/2}$, d. h. die Zeit vom Beginn der Kraftentwicklung bis zum Zeitpunkt der Relaxationsphase, in dem die Hälfte der maximalen

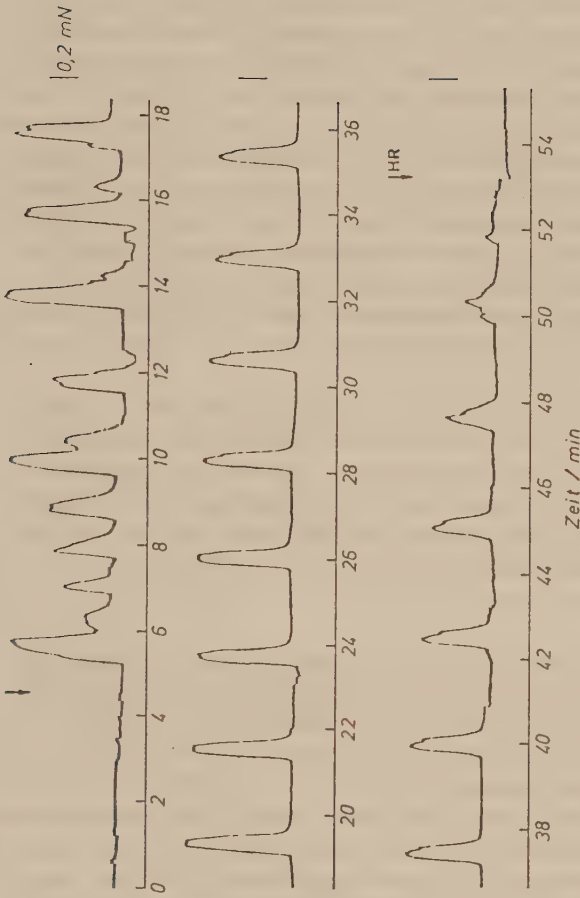


Abb. 3.16

Koffein-induzierte Spannungsozillationen in Gegenwart unterschwelliger Ca^{2+} -Konzentrationen

Die Abbildung zeigt exemplarisch die oszillatorische Kraftentwicklung einer enthäuteten Muskel-faser nach Überführung in eine Freisetzungslösung (Pfeil), die 2 mM Koffein enthält und eine freie Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-8} M besaß. Nach 53 min wurde die Faser wieder in die Erschlaf-fungslösung HR überführt.

[EGTA] = 0,1 mM, [Mg^{2+}] = 1 mM

Kraft erreicht wurde, betrug zwischen 24 und 28 Sekunden. Die kurz nach dem Lösungswechsel auftretenden Spannungssoszillationen waren bzgl. Frequenz und Amplitude sehr unregelmäßig. Oft wurden mehrphasische Spannungstransienten beobachtet. Die Frequenz pendelte sich nach einigen Minuten auf einen relativ konstanten Wert ein. Abb. 3.17 zeigt, daß die Amplitude der Spannungstransienten mit der Zeit abnahm. Diese Abnahme folgte zunächst über einen relativ langen Zeitraum einem linearen Zeitverlauf. Wurde ein "kritischer" Punkt (~ 23 min) erreicht, nahm die Amplitude verstärkt ab, bis schließlich die oscillatorische Aktivität der Faser erlosch. Die Dauer dieser kleinen Spannungstransienten betrug oft das Zweifache der Anfangswerte. In diesem Bereich wurden auch wiederum verstärkt mehrphasische Transienten beobachtet. Eine Abnahme der Kontraktionskraft nach wiederholten Freisetzungsschritten wurde auch von Thieleczek (1982) beschrieben. Die verminderte Ca^{2+} -Freisetzung ließe sich mit einer Entleerung des SR's aufgrund wiederholter zyklischer Ca^{2+} -Freisetzung erklären.

Die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung ist von der freien Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung abhängig (Endo, 1975), d. h. mit zunehmender Koffeinkonzentration ist eine geringere Ca^{2+} -Konzentration für die gleiche Nettofreisetzung von Ca^{2+} notwendig. Spannungssoszillationen sollten daher auch in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen auftreten, wenn die Koffeinkonzentration hinreichend erhöht wird.

Die Schwellenkonzentration für die oscillatorische Aktivität lag bei 5 mM Koffein ([EGTA] = 0,1 mM). Bei dieser Konzentration folgten nach Abklingen eines ersten Spannungsgradienten Oszillationen, deren Amplitude im Vergleich zur anfänglich entwickelten Kraft wesentlich kleiner war. Beginnend bei einer Koffeinkonzentration von 8 mM wurden repetitive Kontraktionen beobachtet, die denen bei einer höheren freien Ca^{2+} -Konzentration beobachteten Oszillationen vergleichbar waren (s. Abb. 3.18). Nach anfänglich unregelmäßig wiederkehrenden Spannungstransienten stellte sich eine annähernd konstante Frequenz



Abb. 3.17

Abnahme der maximalen Kraftentwicklung repetitiver Kontraktionen in
Abhängigkeit von der Zeit

Lösung: $[\text{Koffein}] = 2 \text{ mM}$, $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-6} \text{ M}$, $[\text{EGTA}] = 0,1 \text{ mM}$,
 $[\text{Mg}^{2+}] = 1 \text{ mM}$

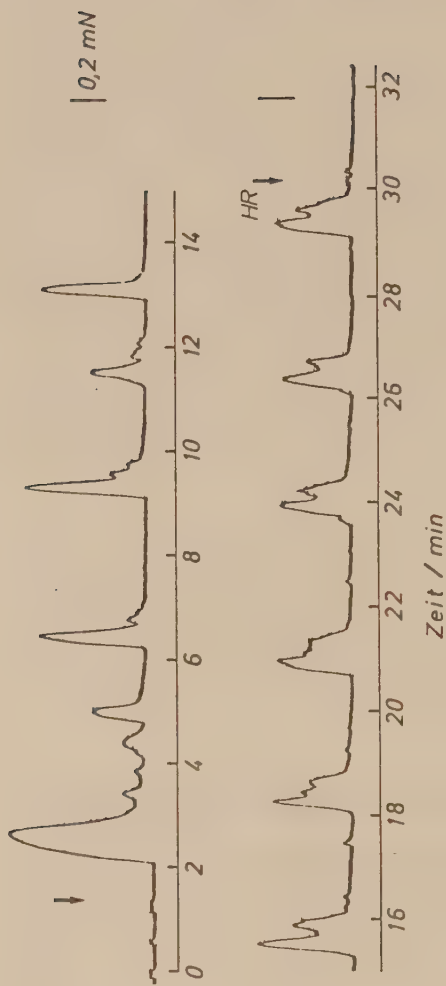


Abb. 3.18

Koffein-induzierte Spannungsz oscillationen in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen

Abgebildet sind die repetitiven Spannungstransienten eines Präparates nach Überführung in eine Koffein-haltige Freisetzungslösung (s. Pfeil).

Lösung: $[\text{Koffein}] = 8 \text{ mM}$, $[\text{Ca}^{2+}] \leq 10^{-8} \text{ M}$, $[\text{EGTA}] = 0,1 \text{ mM}$, $[\text{Mg}^{2+}] = 1 \text{ mM}$

ein. Die Amplitude nahm wiederum mit der Zeit stetig ab.

Koffein verfügt nicht über einen unabhängigen Wirkungsmechanismus, sondern greift wahrscheinlich in die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung ein. Es ist daher wahrscheinlich, daß die in der intakten Faser durch Koffein-induzierten Sarkomeroszillationen auf denselben Mechanismus zurückzuführen sind wie die an der enthäuteten Faser beobachteten Spannungszusammenkürzungen. Bei einer geeigneten Ausbalancierung der verschiedenen Puffersysteme im intrazellulären Milieu sollten sich daher auch an der enthäuteten Faser unterschwellige Sarkomeroszillationen reproduzieren lassen. Die um die freien Calciumionen konkurrierenden Puffersysteme sind auf der einen Seite der myofibrilläre Raum und das sarkoplasmatische Retikulum der Muskelfaser und auf der anderen Seite die Pufferkapazität von EGTA in der Badlösung. Die Nettofreisetzung von Ca^{2+} aus dem SR ist von der freien Ca^{2+} -Konzentration und damit indirekt von der Koffeinkonzentration der Badlösung abhängig. Die Menge an freiem EGTA müßte so gewählt werden, daß sie einerseits ausreicht, eine überschwellige - d. h. über der Kontraktionsschwelle liegende - Aktivierung des kontraktile Apparates zu verhindern, andererseits jedoch eine Aktivierung einzelner Sarkomere zuläßt. Es zeigte sich, daß sich ein derartiges Gleichgewicht leichter in einem System einstellen läßt, daß sensitiver auf Veränderungen der freien Ca^{2+} -Konzentration reagiert.

3.2.2 Sarkomeroszillationen und Spannungszusammenkürzungen bei einer erniedrigten freien Mg^{2+} -Konzentration

Seit langem ist der inhibitorische Einfluß einer Erhöhung der freien Mg^{2+} -Konzentration auf die isometrische Kraftentwicklung der enthäuteten Faser bekannt (Weber, Herz & Reiss, 1969). Eine transiente Spannungsentwicklung infolge einer Erniedrigung der freien Mg^{2+} -Konzentration wurde zunächst auf eine erleichterte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR zurückgeführt

(Ford & Podolsky, 1972). Spätere Untersuchungen lassen jedoch darauf schließen, daß wahrscheinlich die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR durch eine Reduktion der freien Mg^{2+} -Konzentration gehemmt wird (Ford & Podolsky, 1977; Stephenson, 1981b; Stephenson & Podolsky, 1977). Eine daraus resultierende Erhöhung der lokalen Ca^{2+} -Konzentration könnte auf diese Weise mit zur Aktivierung der Myofilamente beitragen.

In den folgenden Experimenten wurde die freie Mg^{2+} -Konzentration der Badlösungen von 1 mM auf 0,1 mM reduziert. Die Koffeempfindlichkeit der Präparate verschob sich drastisch zu niedrigeren Koffeinkonzentrationen. Die Schwellenkonzentration zur Auslösung einer Kontraktion lag bei 0,1 mM Koffein. Dem ersten Spannungstransienten folgten bei dieser Konzentration in der Regel einige wenige weitere, jedoch wesentlich kleinere Spannungssoszillationen (s. Abb. 3.19 o.). Wurde die Koffeinkonzentration auf 1 mM erhöht, waren nach einer schnellen Anstiegsphase zunächst in der Rückkehrphase der Spannungstransienten kleinere Oszillationen zu beobachten. Die Kraft sank bis auf eine Restspannung ab, der kleinere Spannungssoszillationen aufgesetzt waren (s. Abb. 3.19 u.). Die Oszillationen unterschieden sich in zwei Punkten von denen, die bei einer höheren freien Mg^{2+} -Konzentration beobachtet wurden: Die Amplitude nahm nicht kontinuierlich ab, sondern stellte sich auf einen konstanten Wert ein, der ca. die Hälfte der zu Beginn entwickelten Spannung betrug. Dagegen war die Frequenz um ein Vielfaches höher ($> 2 \text{ s}^{-1}$).

Im Einklang mit der erhöhten Empfindlichkeit der Präparate gegenüber Koffein war eine Sensitivierung des kontraktile Appa- rates gegenüber Ca^{2+} zu verzeichnen. Eine freie Ca^{2+} -Konzentration von $7.9 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($[\text{EGTA}] = 0,1 \text{ mM}$) induzierte nach einer Latenzphase von ca. 60 Sekunden repetitive Kontraktionen, wie sie bei höheren freien Mg^{2+} -Konzentrationen bei demselben pCa-Wert nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Koffein zu beobachten waren (s. Abb. 3.20).

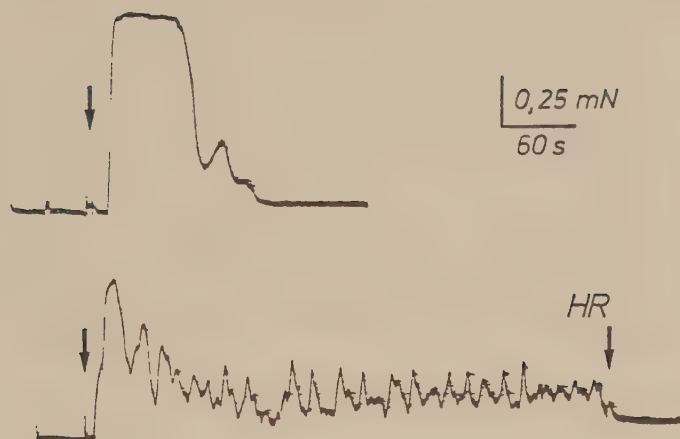


Abb. 3.19

Koffein-induzierte Spannungsentwicklung in Gegenwart niedriger freier Mg^{2+} -Konzentrationen

oben: Überführung des Präparates in eine Testlösung (Pfeil), die 0,1 mM Koffein enthielt und mit 0,1 mM EGTA gepuffert war

unten: Überführung desselben Präparates in eine Testlösung (Pfeil), deren Koffeinkonzentration auf 1 mM erhöht wurde

Alle Erschlaffungs-, Ladungs- und Waschlösungen besaßen eine freie Mg^{2+} -Konzentration von 0,1 mM.

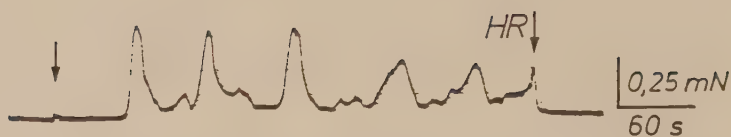


Abb. 3.20

Ca^{2+} -induzierte Spannungssoszillationen bei einer freien Mg^{2+} -Konzentration von 0,1 mM

Repetitive Kontraktionen nach Überführung des Präparates in eine Ca^{2+} -Freisetzungslösung (Pfeil), die eine freie Ca^{2+} -Konzentration von 8×10^{-7} M besaß und mit 0,1 mM EGTA gepuffert war.

Die Ca^{2+} -Freisetzungslösung erwies sich als geeignetes Hilfsmittel, mit dem sich die Aktivierung der Myofilamente in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Pufferung der Badlösung graduell beeinflussen ließ. Die Empfindlichkeit des kontraktile Apparates nahm mit zunehmender freier EGTA-Konzentration ab. Bei einer Erhöhung der freien EGTA-Konzentration auf 0,5 mM war ein Zustand erreicht, bei dem keine meßbare Spannungsentwicklung mehr zu verzeichnen war; dagegen war eine unterschwellige Aktivierung der Sarkomere zu registrieren, wie sie an der intakten Muskelfaser mit unterschwelligen Koffeinkonzentrationen induziert werden konnte. Die Frequenz der Sarkomeroszillationen lag im erwarteten Frequenzbereich zwischen 1 und 3 s^{-1} (s. Abb. 3.21).

Wie schon die Versuche zum Einfluß des Membranpotentials vermuten ließen (3.1.5), ist das Phänomen der Sarkomeroszillationen offensichtlich einem intrazellulären Prozeß zuzuordnen. Das Ca^{2+} -induzierte Auftreten läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Sarkomeroszillationen einen Mechanismus darstellen, der nicht isoliert von der elektro-mechanischen Kopplung betrachtet werden kann. Sie repräsentieren vielmehr einen Prozeß, der im Schwellenbereich der Aktivierung anzuordnen ist.

3.2.3 Zerstörung der SR-Membran durch Triton X-100

Fabiato und Fabiato (1975, 1978a, 1978b) beobachteten in enthäuteten Herzmuskelzellen sowohl Myofilament-gesteuerte als auch durch zyklische Aktivität des SR's induzierte Spannungsozillationen. Neben den schon erwähnten SR-gesteuerten Spannungsozillationen beschrieben Fink et al. (1986) ebenfalls für enthäutete Skelettmuskelfasern Oszillationen myofibrillären Ursprungs, die durch eine Erhöhung der Ionenstärke des intrazellulären Mediums induziert wurden. Nach den vorausgehenden Untersuchungen stellt sich auch hier die Frage, welcher Struktur innerhalb des Intrazellulär-raums die oszillatorische Aktivität zuzuordnen ist.

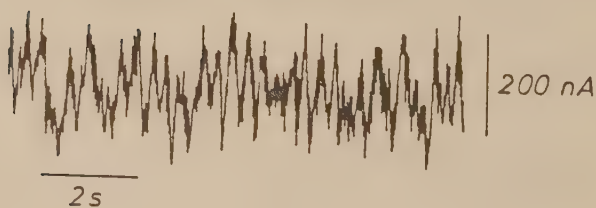
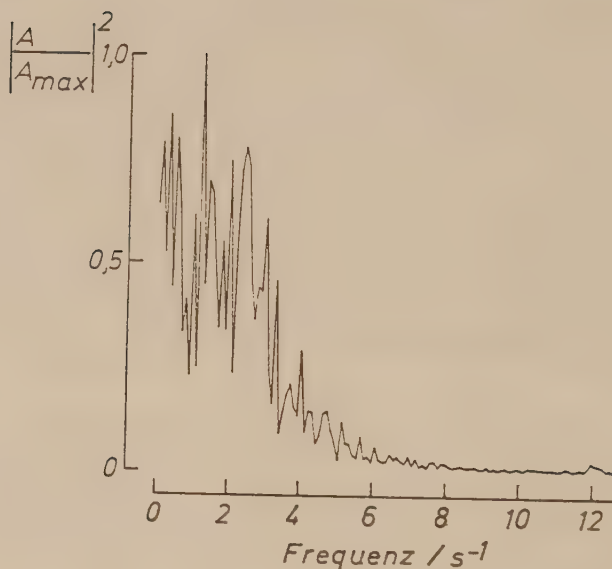


Abb. 3.21

Ca^{2+} -induzierte Sarkomeroszillationen in der enthäuteten Muskelfaser

Die Abbildung zeigt unten die Lichtsignale einer oszillierenden Faser nach Überführung in eine Ca^{2+} -Freisetzungslösung, die eine freie Ca^{2+} -Konzentration von $8 \times 10^{-7} \text{ M}$ besaß und mit $0,5 \text{ mM}$ EGTA gepuffert war ($[\text{Mg}^{2+}] = 0,1 \text{ mM}$). Oben ist das dazugehörige Frequenzspektrum abgebildet. Das Spektrum ergab sich als Mittelung von 16 Lichtintensitätsspur-
ren à 10 s Dauer. Die Abtastrate betrug 100 s^{-1} .

Zur Klärung dieser Frage wurden die Präparate einer milden Detergenzienbehandlung - 0,5 % (v/v) Triton X-100 (Serva) - ausgesetzt. Die Membranen des SR's sollten durch das Detergenz "perforiert" werden, während die myofilamentären Strukturen unversehrt bleiben. Die Präparate wurden nach einer vorhergehenden Überprüfung der oszillatorischen Aktivität 10 Minuten lang in Triton X-100 inkubiert. Nach einer kurzen Latenzzeit nahm die Ruhespannung geringfügig zu, kehrte jedoch innerhalb der Inkubationszeit wieder auf ihren ursprünglichen Ruhewert zurück. Der leichte Kraftanstieg weist auf eine Perforation der SR-Membranen und einen damit verbundenen Ausstrom von Calciumionen aus dem SR hin. Unter Versuchsbedingungen, unter denen zuvor Spannungsozillationen oder auch Sarkomeroszillationen auftraten, war nach der Detergenzienbehandlung keine oszillatorische Aktivität mehr zu beobachten. In einigen Fällen war im Anschluß an die Detergenzienbehandlung nach Zugabe von Koffein eine Zunahme der Ruhespannung zu verzeichnen - ein Indiz dafür, daß die SR-Membranen nicht vollständig zerstört waren und gespeichertes Ca^{2+} freigesetzt wurde. Dieser Kraftanstieg war jedoch in keinem Fall von oszillatorischen Bewegungen begleitet.

Offensichtlich ist das SR die entscheidende Struktur, welche die oszillatorische Aktivität kontrolliert. Da sich auch in der intakten Skelettmuskelfaser keinerlei Anhaltspunkte für ein depolarisationsinduziertes Auftreten der Sarkomeroszillationen ergaben, läßt sich derselbe Mechanismus wohl auch für die intakte Muskelfaser postulieren. Die Ergebnisse sollten daher im Rahmen der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung diskutiert werden.

3.3 Untersuchungen zur Charakterisierung eines vom oszillierenden Muskel freigesetzten "Modulators":
Aufreinigung der Substanz und Überprüfung der Aktivität

Kumbaraci und Nastuk (1982) beschrieben die Freisetzung einer niedermolekularen Substanz aus dem oszillierenden Muskel. Aufgrund von Dialyseexperimenten und mit Hilfe der Ausschlußchromatographie schätzten sie das Molekulargewicht auf 1000 g/mol, photometrische Messungen ergaben ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 245 nm. Diese Substanz war interessant, da sie ihrerseits - unter eng definierten Versuchsbedingungen - wiederum Sarkomeroszillationen in der Skelettmuskelfaser induzierte und ihr möglicherweise eine physiologische Bedeutung im Prozeß der elektro-mechanischen Kopplung zukommen könnte. Den Autoren gelang eine erste Charakterisierung der Substanz, indem sie gelchromatographisch das vom Muskel freigesetzte Material von dem ebenfalls in der Extrazellulärlösung enthaltenen Koffein trennten und spektralphotometrisch das Absorptionsmaximum ermittelten. Experimente zur Überprüfung der Reinheit des Materials wurden nicht durchgeführt. Das somit erhaltene Material wurde anschließend auf seine biologische Aktivität am Muskel untersucht. Der verwendete biologische Test erwies sich als problematisch, da die Substanz nur unter eng umgrenzten Versuchsbedingungen aktiv war. Kumbaraci und Nastuk (1982) benutzten als Parameter für die Aktivitätsmessungen die Latenzzeit, d. h. die Zeit von der Koffeinzugabe bis zum Einsetzen der Oszillationen. Die Autoren beschrieben in ihren Experimenten stets eine Latenzzeit von 20 - 30 Minuten (bei Raumtemperatur). Wurde einer Koffeinelösung, die die übliche Koffeinkonzentration zur Auslösung der Oszillationen enthielt, das vom Muskel freigesetzte Material zugesetzt, so reduzierte sich die Latenzzeit drastisch. Die Abnahme der Latenzzeit wurde als Maß für die Aktivität des endogenen Materials eingesetzt. Die Problematik dieses Aktivitätstests ist darin begründet, daß das Präparat zu Beginn des Aktivitätstests stets zwei- bis dreimal kurz in Koffein-Ringerlösung inkubiert wur-

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

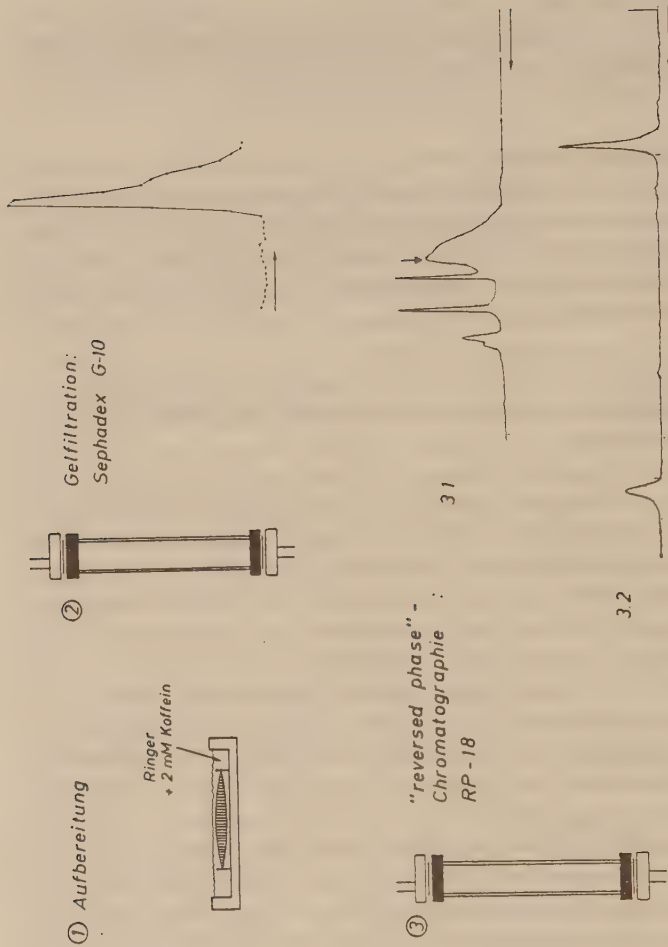


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

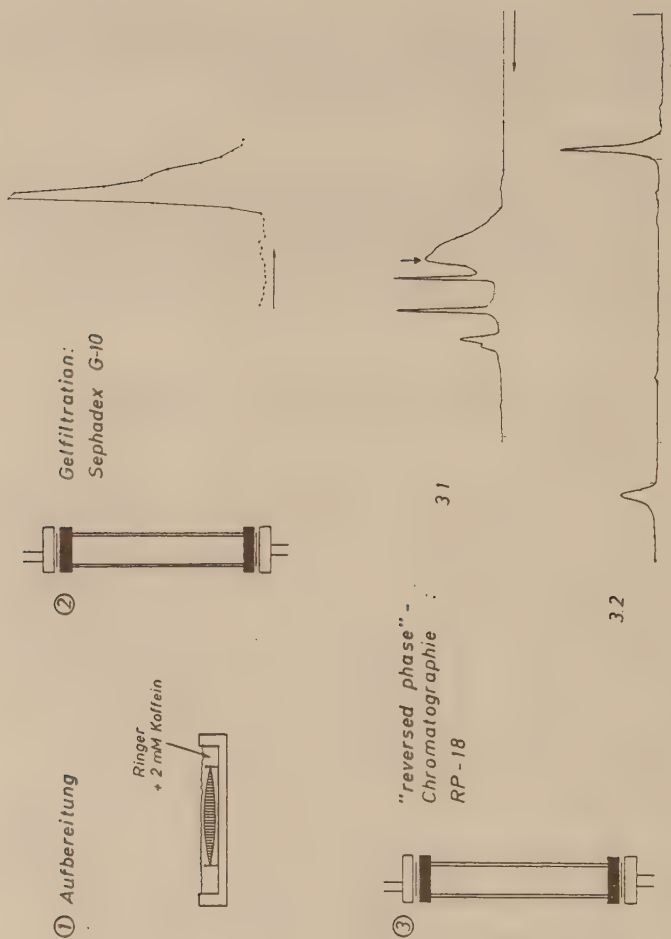


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

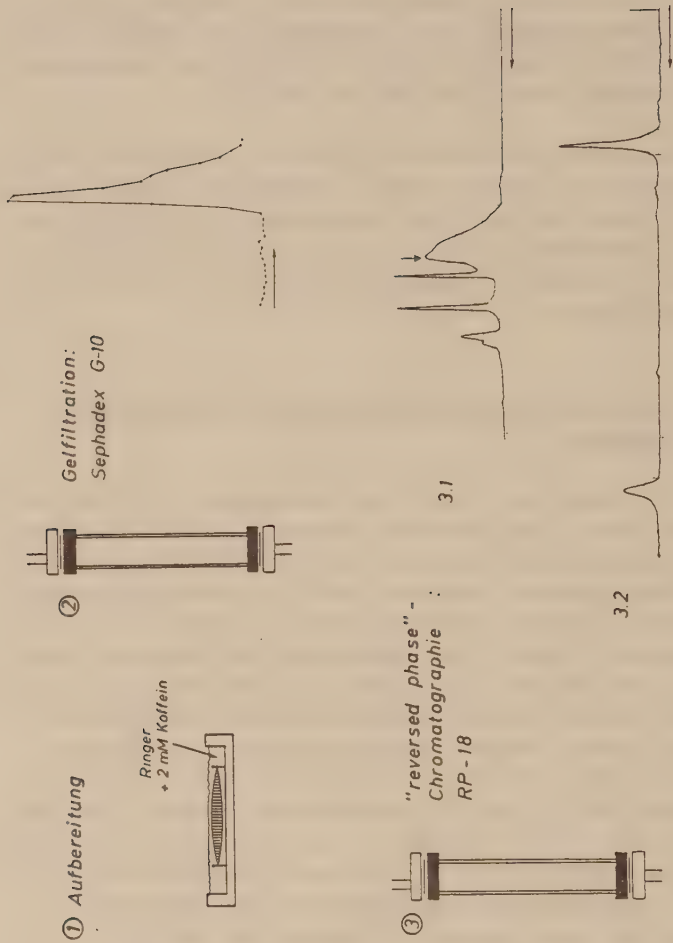


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

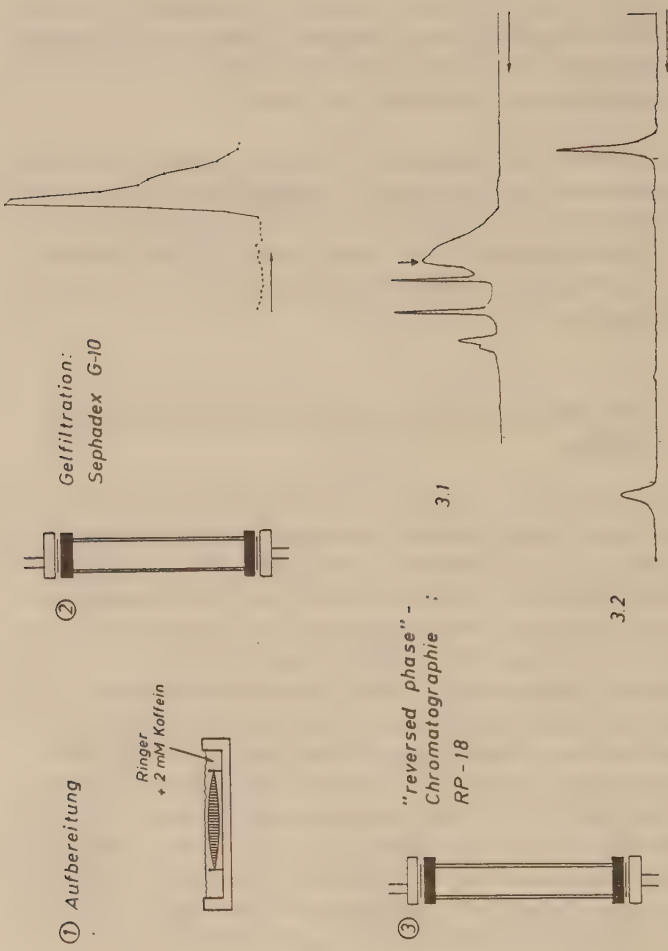


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

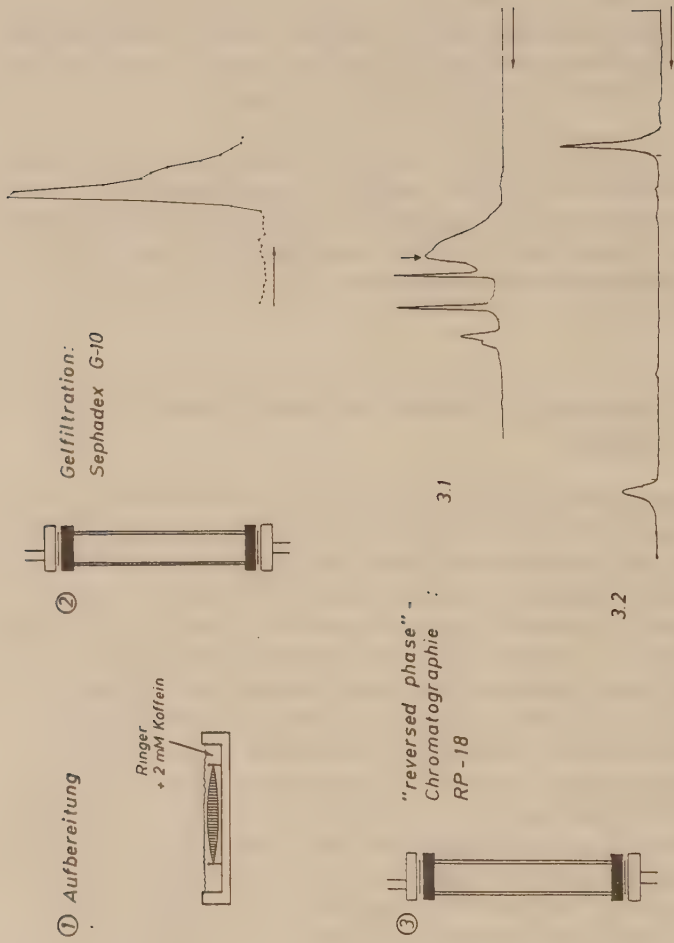


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

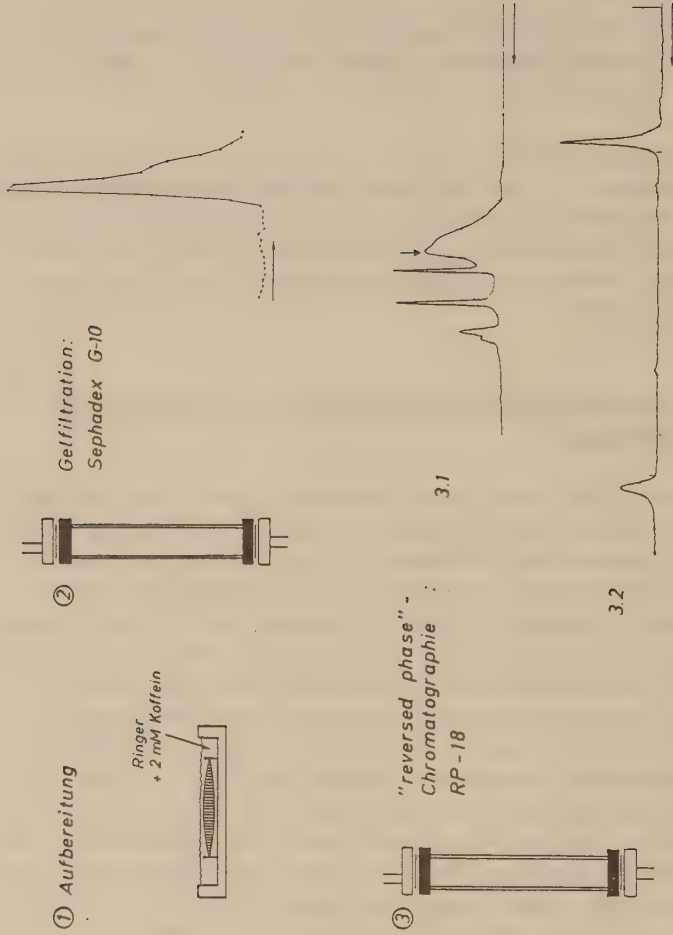


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

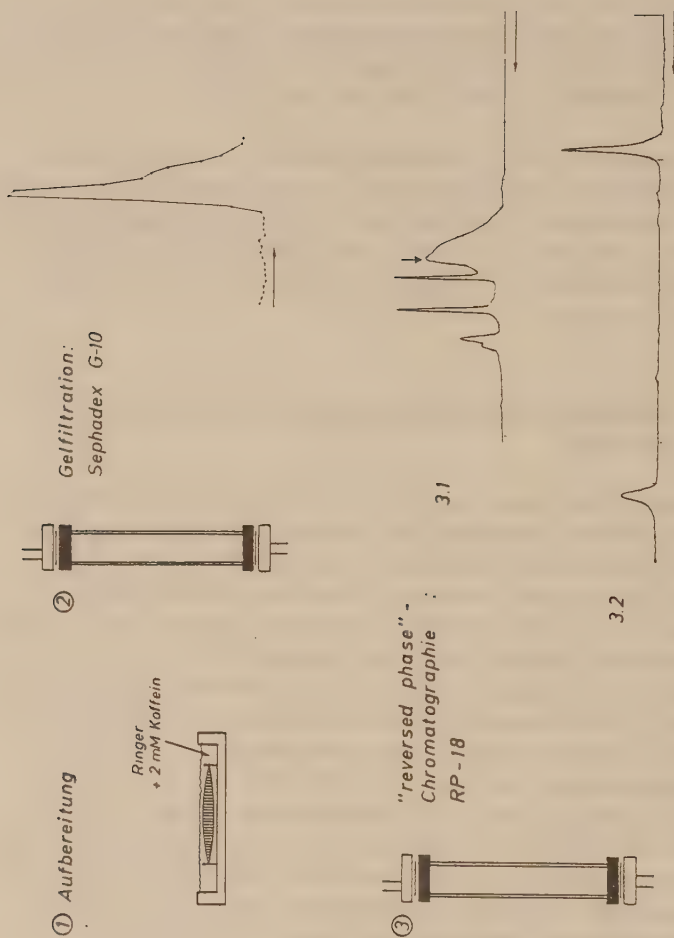


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

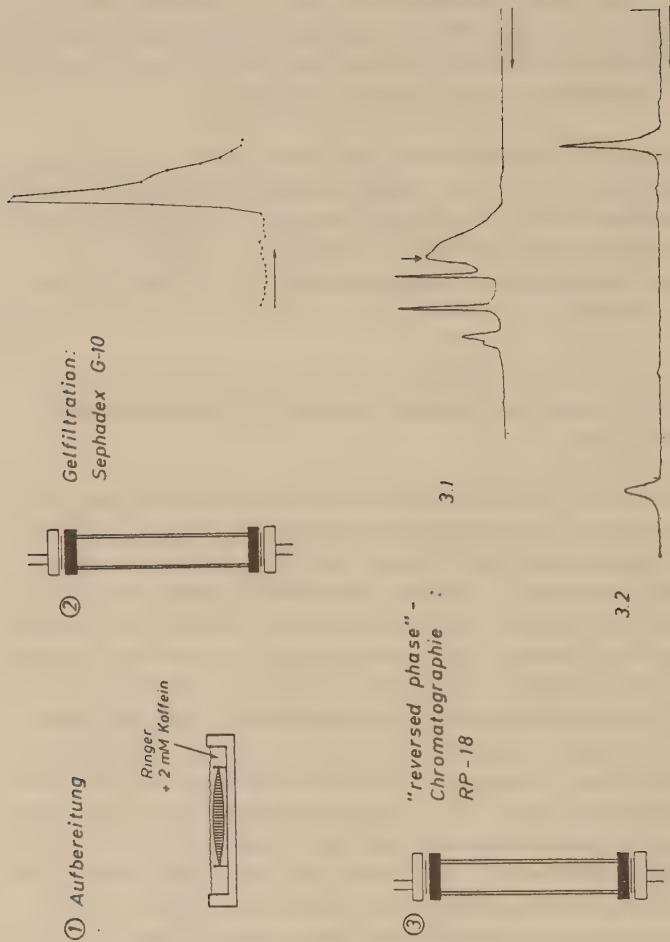


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

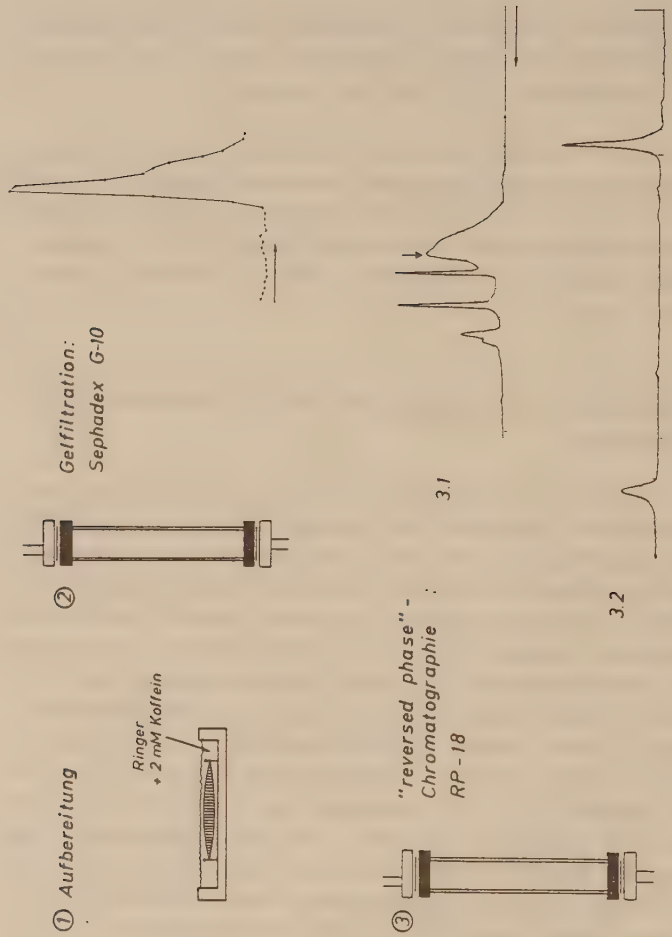


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

de, bevor über eine Mikroperfusion das zu testende Material der (Koffein-haltigen) Lösung zugesetzt wurde. Wurde Koffein aus der Badlösung entfernt, zeigte das Material keinerlei Aktivität (persönliche Mitteilung von Nastuk).

Die im folgenden beschriebenen Experimente knüpfen an diese Untersuchungen an. Die vom Muskel freigesetzte Substanz konnte weiter aufgereinigt und einer Substanzklasse zugeordnet werden. Die biologische Aktivität wurde sowohl an der intakten wie an der enthäuteten Skelettmuskelfaser in Koffein-freien Lösungen getestet.

3.3.1 Freisetzung und Aufarbeitung des zu untersuchenden Materials

Über einen bisher noch ungeklärten Mechanismus wird vom oszillierenden Muskel eine Substanz freigesetzt, die als gelöster Stoff in der Extrazellulärlösung vorliegt. Eine Analyse des unbekannten Materials erfordert somit eine Untersuchung der Badlösung, in welcher die Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang inkubiert wurden. Eine Aufreinigung des Materials setzt zunächst eine Abtrennung der neben anorganischen Salzen in der Badlösung enthaltenen organischen Substanzen, dem pH-Puffer HEPES und Koffein, voraus. Die Abtrennung dieser ebenfalls niedermolekularen Substanzen erfolgte über die Gelfiltration (Schritt 2; Abb. 3.22). Die Untersuchungen ergaben, daß sich das Material, welches freigesetzt wird, aus verschiedenen Komponenten zusammensetzte. Die "reversed phase"-HPLC erwies sich als geeignetes Chromatographieverfahren zur Auftrennung des Materials in diese verschiedenen Komponenten (Schritt 3.1, 3.2; Abb. 3.22). Zur Aufreinigung waren zwei Elutionen in verschiedenen Puffersystemen notwendig. Nach jedem einzelnen Trennungsschritt wurde die Aktivität der eluierten Fraktionen auf die Skelettmuskelfaser getestet.

Um Verunreinigungen der Extrazellulärlösung mit Stoffen zu

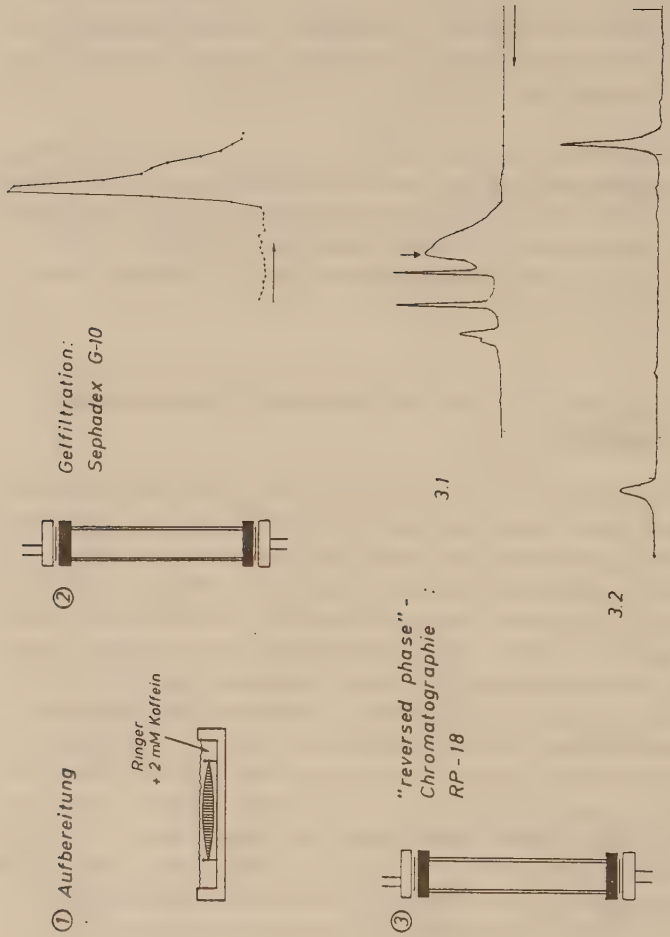


Abb. 3.22

Text s. folgende Seite

Abb. 3.22

Gewinnung und Aufreinigung des vom oszillierenden Muskel freigesetzten Materials (schematischer Überblick)

1. Gewinnung des Materials: Acht ganze Muskelpräparate wurden zwei Stunden lang in 2 mM Koffein-Ringerlösung bei 10 °C inkubiert. Die Badlösung wurde danach aufgenommen und für weitere Aufreinigungsschritte im Rotationsverdampfer bei max. 40 °C eingedunstet.
2. Gelfiltration: Das in der Badlösung enthaltene Koffein wurde durch eine Elution über eine Sephadex G-10 - Säule von dem zu untersuchenden Material getrennt.
3. "Reversed phase"-HPLC: Das freigesetzte Material wurde in zwei Elutionsschritten über eine RP-18 - Säule in unterschiedlichen Puffersystemen in verschiedene Komponenten aufgetrennt.

vermeiden, die aus angeschnittenen Muskelfasern austraten, wurden die Präparate sorgfältig von angrenzendem Gewebe gesäubert. Die Badflüssigkeit wurde, wie im Methodikteil beschrieben, nach einer Inkubationszeit der Präparate von zwei Stunden aufgenommen und der pH-Wert der Lösung gemessen. Es war stets eine geringfügige Abnahme des pH-Wertes zu verzeichnen. Das vom oszillierenden Muskel freigesetzte Material muß nicht zwingend Ursache für die Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich sein. Wahrscheinlicher ist, daß ausgeschiedene Stoffwechselprodukte (z. B. Milchsäure) zur Ansäuerung der Badlösung beitrugen.

3.3.2 Trennung des freigesetzten Materials von Koffein

Im ersten Trennungsschritt wurde das zu untersuchende Material analog Kumbaraci und Nastuk (1982) vom ebenfalls in der Extrazellulärlösung enthaltenen Koffein getrennt. Die Gelfiltration über eine Sephadex G-10 - Säule erlaubte eine saubere Trennung dieser beiden Komponenten ohne Überschneidung der Elutionsprofile. Zur Identifizierung des unbekannten Materials wurde die Absorption einer jeden Fraktion bei einer Wellenlänge von 245 nm photometrisch gemessen. Koffein ließ sich aufgrund seines im höheren UV-Bereich liegenden Absorptionsmaximums von 272 nm davon trennen. Das zu untersuchende Material wurde in den Fraktionen 18 - 25 (1), das im Vergleich dazu kleinere Molekül Koffein (MW = 194,2) in den Fraktionen 33 - 50 (2) eluiert (s. Abb. 3.23). Die genannte Abbildung zeigt die Elutionsprofile zweier Aufbereitungen, in denen zwei Muskeln einmal in Koffein-Ringer- und im Vergleich dazu dieselbe Zeitdauer in Ringerlösung inkubiert wurden. Offensichtlich wird auch vom inaktiven Muskel in geringem Umfang das niedermolekulare Material freigesetzt. Die freigesetzte Substanzmenge betrug im Durchschnitt 30 % des vom oszillierenden Muskel freigesetzten Materials. (Die Berechnung setzt voraus, daß sowohl vom inaktiven wie auch vom oszillierenden Muskel das gleiche Material freigesetzt wird.)

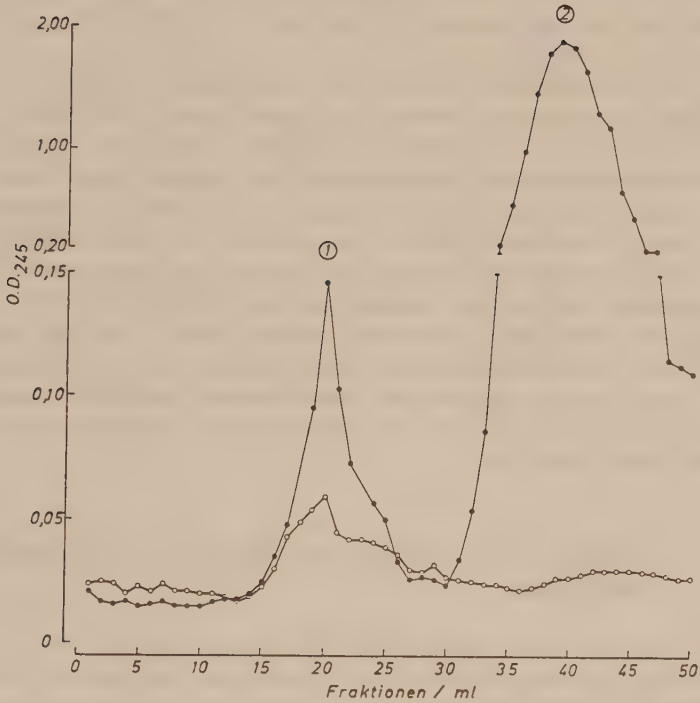


Abb. 3.23

Trennung des vom Muskel freigesetzten Materials von Koffein

Abgebildet sind die Elutionsprofile zweier Aufarbeitungen, die a) von zwei inaktiven Muskelpräparaten in Ringerlösung (○) und b) von zwei oszillierenden Muskeln in 2 mM Koffein-Ringerlösung (●) gewonnen wurden. Die optische Dichte einer jeden eluierten Fraktion wurde bei einer Wellenlänge von 245 nm gemessen und gegen die einzelnen Fraktionen (ml) aufgetragen. - Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinate! - Der Absorptionspeak (1) repräsentiert das vom Muskel freigesetzte Material, der Absorptionspeak (2) das in der Badlösung enthaltene Koffein.

Die Menge des freigesetzten Materials stieg mit der Anzahl der eingesetzten Präparate. Die freigesetzte Substanzmenge nahm jedoch nicht linear mit der Anzahl der verwendeten Muskeln zu. Die erhaltene Menge hing augenscheinlich von Oberfläche und Größe der Muskelpräparate wie auch von der Stärke der oszillatorischen Aktivität ab.

Für jede Aufarbeitung, die weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen werden sollte, wurden acht Muskelpräparate (M. cutaneus pectoris und M. sartorius) verwendet. Abb. 3.24 zeigt das Elutionsdiagramm einer Aufarbeitung, die aus acht oszillierenden Muskeln gewonnen wurde. Es wurde nur der Absorptionspeak, der dem freigesetzten Material zuzuordnen ist, aufgezeichnet. Auffällig ist zum einen die Asymmetrie des Elutionsprofils; zum anderen sind im absteigenden Ast des Absorptionspeaks deutliche Schultern zu erkennen, welche darauf hinweisen, daß wahrscheinlich unter diesem Absorptionspeak nicht ein homogener Stoff, sondern ein Gemisch verschiedener Substanzen eluiert wird. Die weitere chromatographische Auftrennung bestätigte diese Vermutung.

3.3.3 Auftrennung des freigesetzten Materials in verschiedene Komponenten

Neben der "reversed phase"-HPLC stand für die weitere Aufreinigung die Ionenaustauschchromatographie zur Diskussion. Vorversuche ergaben, daß das Material nicht an einen Kationenaustauscher bindet. Ein Teil des Materials wird jedoch an einen Anionenaustauscher gebunden. Durch eine Elution über eine Sephadex A-25 - Säule (40 - 120 μ , Sigma) konnte das Material in vier größere Fraktionen aufgespalten werden, von denen zwei erst innerhalb eines NaCl-Gradienten (0 - 0,5 M) eluiert wurden (s. Herrmann, 1986). Die hohen Salzkonzentrationen, die aus dem Gradienten resultierten, erwiesen sich jedoch für die anschließenden Aktivitätsmessungen als störend.

Stattdessen wurde ein "reversed phase"-HPLC-System zur weite-

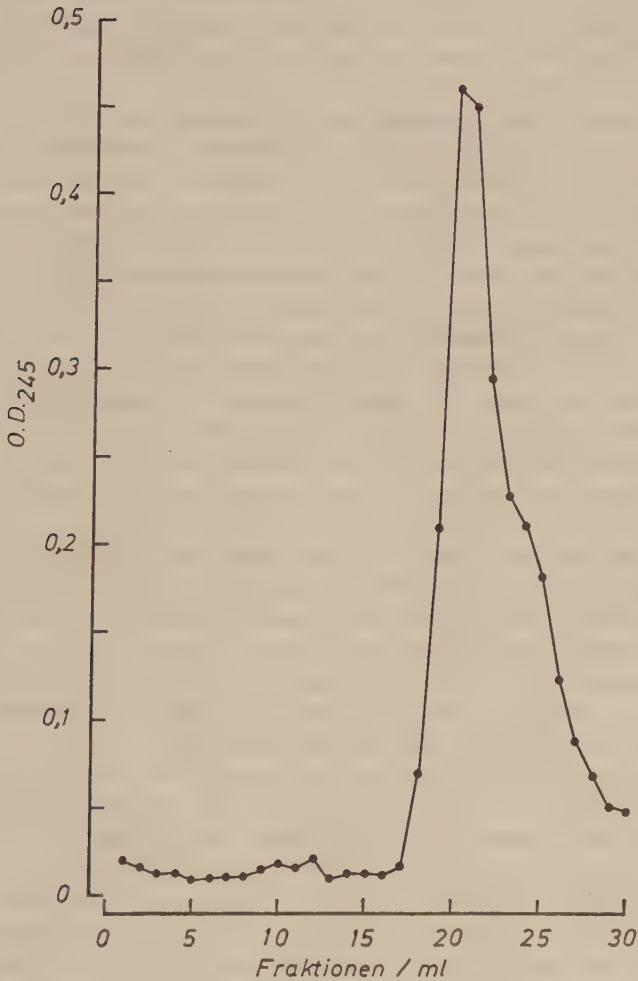


Abb. 3.24

Elutionsdiagramm des zu untersuchenden Materials aus einer Aufarbeitung von acht Muskelpräparaten

Acht Muskelpräparate wurden jeweils zwei Stunden lang in 2 mM Koffein-Ringerlösung inkubiert. Der abgebildete Absorptionspeak entspricht dem vom oszillierenden Muskel freigesetzten Material. Koffein wurde in den Fraktionen 38 - 50 eluiert.

ren Aufreinigung gewählt. Die verwendeten Puffersysteme hatten den Vorteil, daß sie aus flüchtigen Stoffen zusammengesetzt waren und somit leicht aus den eluierten Fraktionen entfernt werden konnten.

Wie schon in der Ionenaustauschchromatographie wurde das freigesetzte Material in vier Komponenten aufgespalten (Abb. 3.25). Der Elutionspuffer setzte sich aus Methanol, Wasser und Acetonitril im Verhältnis 6:10:1 zusammen. Die Fraktionen wurden aufgefangen und ihre Aktivität am Skelettmuskel getestet. Lediglich die erste, relativ polare Komponente erwies sich als aktiv. Die Aktivität in der intakten Skelettmuskelfaser war sehr schwach ausgeprägt. Das Material induzierte kleine, unregelmäßige Sarkomeroszillationen, deren Amplitude wesentlich kleiner und deren Zeitverlauf langsamer als die Koffein-induzierter Oszillationen waren. In der enthäuteten Muskelfaser löste das Material dagegen repetitive Kontraktionen aus, wie sie auch durch Koffein und Ca^{2+} induziert werden konnten. Abb. 3.26 a zeigt ein derartiges Aktivierungsexperiment in einer intrazellulären Lösung, die eine freie Mg^{2+} -Konzentration von 1 mM besaß und mit 0,1 mM EGTA gepuffert war. Nach einem anfänglichen Spannungstransienten pendelte sich die Kraft auf ein erhöhtes Niveau ein, dem kleinere Spannungstransienten aufgesetzt waren. Reduzierte man die freie Mg^{2+} -Konzentration auf 0,1 mM, so ließen sich einzelne, voneinander getrennte, repetitive Spannungstransienten beobachten.

Ebenso wie die Ca^{2+} - und Koffein-induzierten Spannungsozillationen war die oszillatorische Aktivität von der Höhe der freien EGTA-Konzentration und damit von der Höhe der Ca^{2+} -Pufferung abhängig. Bei einer Erhöhung der freien EGTA-Konzentration auf 0,2 mM wurde ein Niveau erreicht, bei dem keine Kraftentwicklung mehr, jedoch eine unterschwellige Aktivierung einzelner Sarkomere zu verzeichnen war, die sich in Form von Sarkomeroszillationen äußerte. Die maximale Frequenz lag mit 2 s^{-1} im üblichen Frequenzbereich (Abb. 3.26 b).

Auch hier stellte sich die Frage, von welcher intrazellulären Struktur die oszillatorische Aktivität gesteuert wird. Analog zu Koffein- und Ca^{2+} -induzierten Oszillationen war nach einer

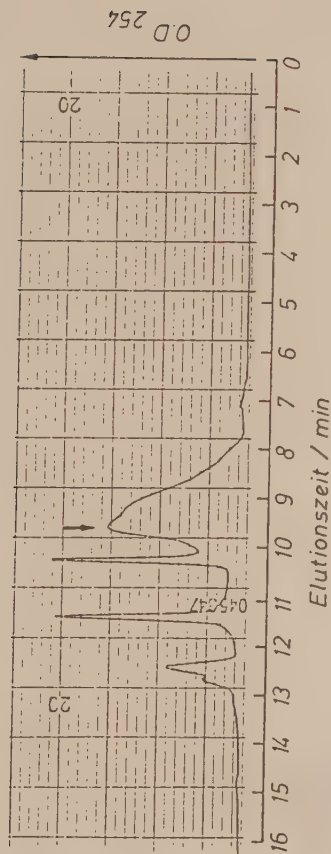


Abb. 3.25

Aufspaltung des freigesetzten Materials in vier Komponenten

Das vom oszillierenden Muskel freigesetzte Material wurde durch eine Elution über eine präparative RP-18 - Säule in vier Komponenten gespalten. Das Puffersystem setzte sich aus Methanol, Wasser und Acetonitril im Verhältnis 6 : 10 : 1 zusammen. Die optische Dichte wurde kontinuierlich bei 254 nm gemessen und gegen die Elutionszeit aufgetragen. Die erste, polare Komponente (s. Pfeil) erwies sich als einzige aktiv.

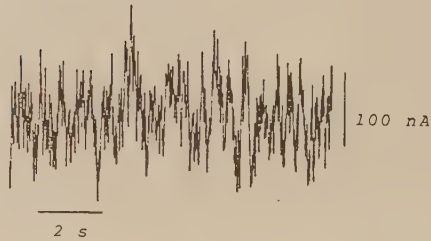
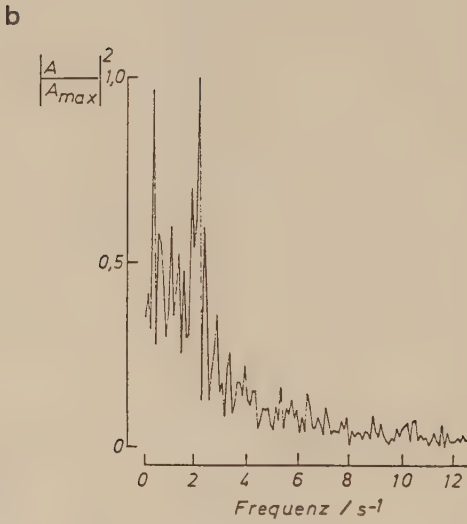
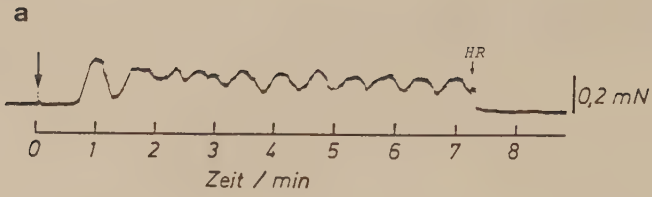


Abb. 3.26
Text s. folgende Seite

Abb. 3.26

Aktivitätsmessungen an der enthäuteten Muskelfaser

a) Induktion von Spannungsozillationen

Die aktive Komponente induzierte in der enthäuteten Skelettmuskelfaser repetitive Kontraktionen. Das Material wurde in eine Aktivierungslösung, die 1 mM freies Mg^{2+} enthielt und mit 0,1 mM EGTA gepuffert war, aufgenommen. Zu dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt wurde das Präparat in die Testlösung überführt. Bei Rückführung in die Erschlaffungslösung HR setzte die oszillatorische Aktivität sofort aus.

b) Induktion von Sarkomeroszillationen

Wurde die freie EGTA-Konzentration der Aktivierungslösung auf 0,2 mM erhöht, induzierte die aktive Komponente unter-schwellige Sarkomeroszillationen. Die Abbildung zeigt unten die Lichtsignale einer oszillierenden Faser, oben ist das dazugehörige Frequenzspektrum abgebildet. Das Frequenzspektrum ergab sich als Mittelung von sechs Lichtintensitätsspuren à 10 s Dauer, die Abtastrate betrug 100 s^{-1} .

Detergenzien-Behandlung mit Triton X-100 (0,5 %) keine oszillatorische Aktivität mehr zu registrieren. Offensichtlich ist auch in diesem Fall das sarkoplasmatische Retikulum die entscheidende Struktur, welche die oszillatorische Aktivität reguliert.

Das aktive Material wurde unter einem relativ breiten Absorptionspeak eluiert, der in der aufsteigenden Phase eine deutliche Schulter erkennen ließ. Es ist daher wahrscheinlich, daß auch das aktive Material nach diesem Aufreinigungsschritt noch ein Stoffgemisch darstellte.

Zur Überprüfung dieses Punktes wurde ein CD-Spektrum (CD = circular dichroism) im UV-Bereich angefertigt. Das Spektrum ergab ein Absorptionsmaximum des Materials bei 215 nm - einer Wellenlänge, bei der u. a. die Peptidbindung absorbiert. Weitere Absorptionsmaxima traten nicht auf. D. h. das Material setzt sich, falls es sich nicht um eine reine Substanz handelt, aus einem Gemisch strukturell verwandter Stoffe zusammen. Das Absorptionsmaximum schließt Stoffgruppen, die ein aromatisches Ringsystem beinhalten - z. B. die zyklischen und nicht-zyklischen Nukleotide - als mögliche Substanzen aus. Es schließt ebenfalls die Möglichkeit aus, daß es sich bei dem aktiven Material um ein modifiziertes Koffein handelt.

Durch eine zweite Elution in einem polareren Puffersystem konnte das aktive Material erneut in zwei weitere Komponenten aufgespalten werden. Der Methanol-Gehalt wurde bei sonst unveränderter Zusammensetzung auf vier Anteile reduziert (Methanol:Wasser:Acetonitril = 4:10:1). Das Material wurde in eine polare, hydrophile Komponente, die mit der Lösungsfront eluiert wurde, und eine unpolarere, stärker hydrophobe Komponente getrennt (s. Abb. 3.27). Der Aktivitätstest zeigte, daß in diesem Falle die unpolarere Komponente die aktive war. Eine Bestimmung der freien Ca^{2+} -Konzentration der Aktivierungslösung ergab, daß - wahrscheinlich bedingt durch die verwendeten Lösungsmittel - durch Aufnahme des Materials in die entsprechenden intrazellulären Lösungen eine Ca^{2+} -Kontamination her-

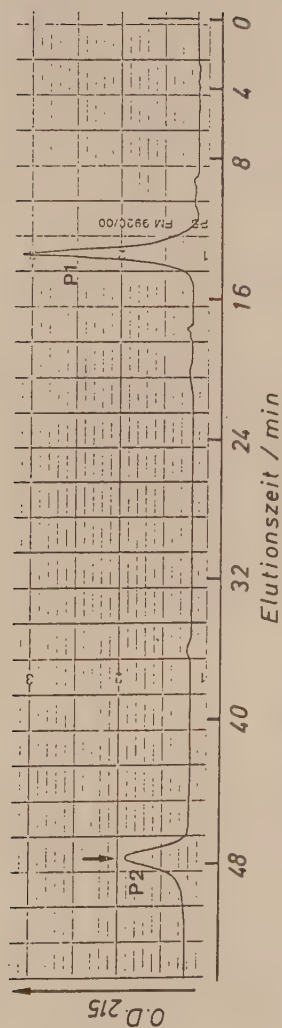


Abb. 3.27

Auftrennung des aktiven Materials in zwei weitere Komponenten

Das aktive Material wurde durch eine zweite Elution über eine RP-18 - Säule in einem polaren Puffer-System (Methanol : Wasser : Acetonitril = 4 : 10 : 1) erneut in zwei Komponenten aufgetrennt. Die an-deren Elutionsbedingungen blieben unverändert. Nach diesem Reinigungsschritt erwies sich die letzte eluierte Komponente (Pfeil) als einzige aktiv.

vorgerufen wurde, die knapp unter der Schwelle zur mechanischen Aktivierung lag. Um den Faktor Calcium als mögliche Ursache für die Aktivität auszuschließen, wurde die Muskelfaser zunächst in eine Aktivierungslösung überführt, welche dieselbe freie Ca^{2+} -Konzentration besaß, aber nicht das zu untersuchende Material enthielt. Abb. 3.28 zeigt exemplarisch einen derartigen Versuch. Die Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration reichte nicht aus, die Muskelfaser zu aktivieren. Erst die Zugabe der Substanz induzierte wiederum oszillatorische Spannungstransienten.

Eine vergleichsweise schwache Aktivität war auch in der intakten Skelettmuskelfaser in Form kleiner, asynchroner Sarkomeroszillationen zu verzeichnen.

Aufgrund der deutlich stärkeren Aktivität des Materials in der enthäuteten Skelettmuskelfaser ist der Wirkort dieses vom Muskel freigesetzten Modulators offensichtlich intrazellulär lokalisiert. Die Parallelität zu Ca^{2+} - und Koffein-induzierten Spannungsozillationen und das Ausbleiben der Aktivität nach einer Zerstörung des SR's weist deutlich auf eine Beeinflussung der SR-gesteuerten zyklischen Ca^{2+} -Freisetzung hin. Es ist anzunehmen, daß das endogene Material eine modulierende Funktion in diesem Prozeß einnimmt.

3.3.4 Bestimmung funktioneller Gruppen

Das Absorptionsmaximum der aktiven Komponente bei 215 nm weist auf die Existenz von Peptidbindungen hin. Da sich aus dem CD-Spektrum keinerlei Anhaltspunkte für eine erhöhte Absorption bei 260 nm ergab, ist die Assoziation aromatischer Ringstrukturen auszuschließen. Somit fällt auch eine umfangreiche Stoffklasse, die zyklischen und nicht-zyklischen Nukleotide, die in zahlreiche intrazelluläre Regulationsprozesse involviert sind, als potentielle Modulatorsubstanzen aus. Das aktive Material wurde daraufhin auf die Existenz von freien Aminogruppen und kovalent gebundenem Phosphat überprüft.



Abb. 3.28

Aktivitätsmessung nach dem zweiten Aufreinigungsschritt

Die aktive Komponente aus dem letzten Aufreinigungsschritt (P2) induzierte wiederum repetitive Spannungstransienten in der enthäuteten Muskelfaser. Die Präparate wurden zunächst in eine Aktivierungslösung überführt, welche dieselbe freie Ca^{2+} -Konzentration wie die Testlösung, in die P2 aufgenommen wurde, besaß (obere Spannungsspur). Nach 3-minütiger Relaxationsphase wurde die Aktivität der zu untersuchenden Komponente P2 getestet (untere Spur). Der erste Spannungstransient trat stets erst nach einer Latenzzeit von einigen Minuten auf. Die Aktivierungslösungen waren mit 0,1 mM ECTA gepuffert und enthielten 1 mM freies Mg^{2+} .

Freie Aminogruppen wurden über die Ninhydrin-Reaktion nachgewiesen. Eine Probe des Materials wurde auf "reversed phase"-Dünnschichtplatten aufgetragen und mit analogen, in der HPLC verwendeten Puffersystemen eluiert. Ein Besprühen der Platten mit Ninhydrin-Reagenz ergab eine positive Reaktion. Dieses Ergebnis wurde in Versuchen, mit einem wesentlich empfindlicheren, fluoreszierenden Reagenz für freie Aminogruppen - Fluorescamin (4-Phenylspiro(Furan-2(3H),1-Phthalan)-3,3'-Dion, Sigma; Imai, Böhlen, Stein & Udenfriend, 1974) - bestätigt. Die Fluoreszenz ließ sich unter langwelligem UV-Licht (366 nm) nachweisen.

Die Phosphatbestimmung nach Ames und Dubin (1960) fiel schwach positiv aus. Zwei Faktoren machten das Testverfahren problematisch:

1. Die verwendeten Puffersysteme für die HPLC sind in geringem Maße mit Phosphat kontaminiert. Die Überprüfung des aktiven Materials ergab dennoch eine schwach positive Reaktion, die sich von der Grundkontamination des verwendeten Puffers abhob.
2. Das Testverfahren erlaubt eine quantitative Phosphatbestimmung bis zu 1 Nanomol. Wie sich später herausstellte, lag die Menge des eingesetzten Materials an der Nachweisgrenze des Testverfahrens.

Dennoch ließ sich mit dem verwendeten Testverfahren ein qualitativer Phosphatnachweis führen. Für eine quantitative Bestimmung müßten jedoch sensitivere Nachweismethoden eingesetzt werden.

3.3.5 .PTC-Aminosäure-Analyse

Die positive Ninhydrin-Reaktion und die Existenz eines Absorptionsmaximums bei 215 nm weisen darauf hin, daß das aktive Material der Substanzklasse der Peptide zuzuordnen ist. Aufgrund dieser Vorinformation wurde eine Aminosäure-Analyse angefertigt. Die PTC-Aminosäure-Analyse ist gegenüber der älteren Me-

thode von Stein und Moore (s. Spackmann, Stein & Moore, 1958) wesentlich empfindlicher. Die Nachweisgrenze freier Aminosäuren liegt im Picomol-Bereich.

Die Aminosäure-Analyse bestätigte die Vermutung auf die Existenz von Peptidmaterial. Es wurde jeweils der Gehalt an freien Aminosäuren einer nicht-hydrolysierten mit dem einer hydrolysierten Probe verglichen. Wie aus Abb. 3.29 hervorgeht, nahm der Anteil an freien Aminosäuren deutlich zu, wenn die Probe hydrolysiert wurde. Dominierend sind die Aminosäuren Glutaminsäure, Serin und Glycin. Geht man davon aus, daß das Material sauber ist und die Aminosäure-Verteilung ein Peptid repräsentiert, sind diese Aminosäuren mit je drei (Glu), drei (Ser) und fünf (Gly) Anteilen, die anderen auftretenden Aminosäuren mit je einem Anteil vertreten (s. Tab. 3.3). Das Molekulargewicht dieses Peptids berechnet sich auf 2410 g/mol oder ein Vielfaches davon.

Der relativ hohe Anteil an Serinresten repräsentiert eine relative Anzahl von Phosphorylierungsstellen im Peptid. Aufgrund dessen bietet sich auch für zukünftige Versuche ein Verfahren zur Bestimmung von Phosphatgruppen an, mit dem auf direktem Wege phosphorylierte Serinreste nachgewiesen werden können (Meyer, 1987). Diese Methode hat außerdem den Vorteil, daß sie wesentlich empfindlicher als der in dieser Arbeit verwendete Phosphattest von Ames und Dubin (1969) ist.

Das Ergebnis der Aminosäure-Analyse zeigt deutlich die Existenz von Peptiden in dem untersuchten Material. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Reinheit des Materials zu überprüfen. Berechnet man die Substanzmenge der nach der Hydrolyse auftretenden Aminosäuren, so erhält man einen Gehalt von 5 - 6 µg pro Aufarbeitung von acht Muskeln. Diese geringe Masse wird sich insbesondere für Strukturuntersuchungen als problematisch erweisen. Für zukünftige Experimente sollten daher andere Wege zur Gewinnung dieses Materials in Betracht gezogen werden.

Abb. 3.29
Text s. folgende Seite

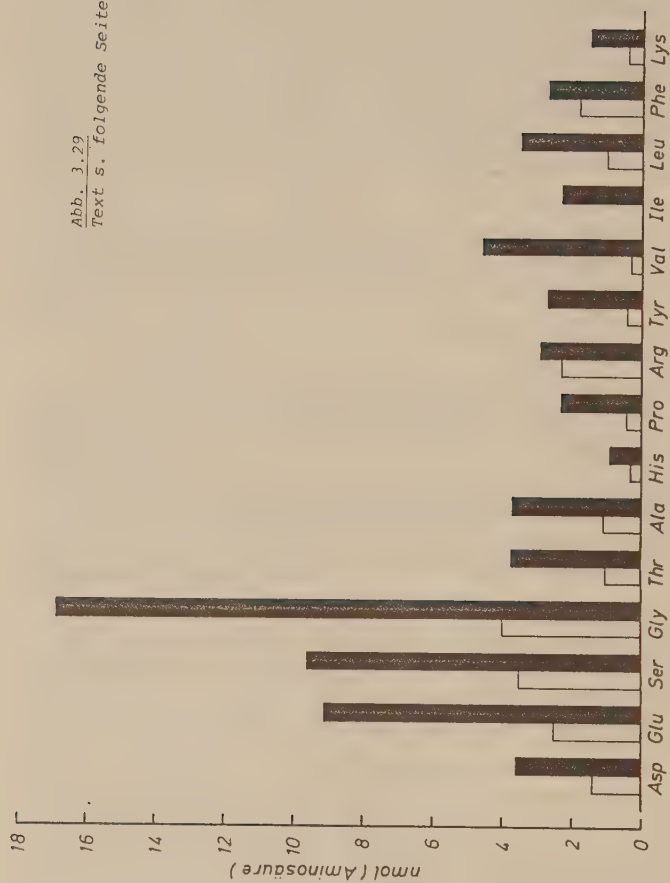


Abb. 3.29

Aminosäuregehalt der aktiven Komponente

Es wurde der Aminosäuregehalt einer nicht-hydrolysierten Probe der aktiven Komponente (weiße Balken) mit dem einer hydrolysierten (schwarze Balken) verglichen. Die angegebene Substanzmenge entspricht dem gesamten Gehalt einer Aufarbeitung von acht oszillierenden Muskeln.

<u>Aminosäure</u>	<u>Anzahl</u>
Asparaginsäure	1
Glutaminsäure	3
Serin	3
Glycin	5
Threonin	1
Alanin	1
Prolin	1
Tyrosin	1
Valin	2
Isoleucin	1
Leucin	1
Lysin	0-1

Tab. 3.2

Aminosäureverteilung der aktiven Komponente

Es ist jeweils das Verhältnis der einzelnen, nach der Hydrolyse auftretenden Aminosäuren zueinander angegeben.

4. DISKUSSION

Sowohl die Experimente an intakten, einzelnen Muskelfasern wie auch an enthäuteten Muskelfaserpräparaten weisen auf einen intrazellulären Mechanismus hin, welcher die oszillatorische Aktivität der Skelettmuskelfaser steuert. Als potentieller Wirkungsmechanismus steht ebenso wie in vielen Herzmuskelpräparaten eine zyklische Freisetzung von Ca^{2+} aus dem bzw. Aufnahme ins sarkoplasmatischen Retikulum zur Diskussion. Es konnte gezeigt werden, daß - in vitro - in diesem Prozeß offenbar eine endogene Substanz involviert ist, welche die oszillatorische Aktivität verstärkt. Im folgenden werden schwerpunktmäßig einige Versuchsergebnisse aus der vorliegenden Arbeit diskutiert, welche diese Arbeitshypothese stützen.

4.1 Auslösung von Sarkomeroszillationen durch Koffein und verwandte Methylxanthine in intakten Skelettmuskelfasern

Koffein gehört zur Gruppe der Stickstoff-methylierten Xanthine und teilt viele seiner Eigenschaften mit den beiden anderen natürlich vorkommenden Methylxanthinen Theophyllin und Theobromin. In hohen Konzentrationen induziert Koffein Kontraktionen der Skelettmuskelfaser, ohne eine signifikante Änderung der elektrischen Eigenschaften der Zellmembran zu verursachen (Axelsson & Thesleff, 1958). Der Effekt wird im allgemeinen auf eine direkte Wirkung von Koffein auf die Membranen des SR's zurückgeführt (Lopez, Alamo, Caputo, Di Polo & Vergara, 1983). Niedrige Konzentrationen der Substanz - unterhalb der Schwelle zur Kontrakturauslösung - verstärken die Amplitude elektrisch induzierter Kontraktionen (Lüttgau & Oetliker, 1968). Im Gegensatz zu kontrakturauslösenden Konzentrationen tritt die Wirkung niedriger Koffeinkonzentrationen potentialabhängig auf (Caputo et al., 1981; Kovacs & Szücs, 1983; Lüttgau & Oetliker, 1968). Der letzte Schritt in der durch Koffein

induzierten Wirkungskette ist, wie von Weber (1968) und Weber und Herz (1968) gezeigt werden konnte, ein Ansteigen der zytosplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration.

In den hier vorliegenden Experimenten war in Gegenwart einer niedrigen Koffeinkonzentration von 2 mM eine unterschwellige Aktivierung der Skelettmuskelfaser zu verzeichnen. Der Wirkstoff induzierte in der intakten Skelettmuskelfaser Oszillationen einzelner Sarkomere, ohne eine meßbare Änderung der Kraftentwicklung zu verursachen. Die Frequenz dieser Oszillationen hing von der Sarkomerlänge ab: Eine maximale Frequenz von ca. 2 s^{-1} war bei einer Sarkomerlänge zwischen 2,6 und 2,7 μm zu registrieren.

Insbesondere die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Oszillationen vom Membranpotential (Kap. 3.1.5) sprechen für einen intrazellulären Wirkort von Koffein:

1. Die Sarkomeroszillationen traten unabhängig vom Membranpotential auf. Sowohl in hyperpolarisierten ($M_{\text{pot}} \leq -100 \text{ mV}$) als auch in völlig depolarisierten, mechanisch "refraktären" Muskelfasern ($M_{\text{pot}} \geq 0 \text{ mV}$) waren über einen längeren Zeitraum Oszillationen unveränderter Frequenz zu beobachten.
2. Im Potentialbereich unterhalb der kontraktiven Schwelle (von -50 bis -60 mV) treten bereits intramembranale Ladungsverschiebungen ("charge movements": s. Text Abb. 1.2) auf, die jedoch noch nicht zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum führen (Melzer et al., 1986). Schon Hodgkin und Horowicz (1960) vermuteten in diesem Potentialbereich einen unterschweligen Prozeß, welcher der Aktivierung der Muskelfaser unmittelbar vorausgeht. Man sollte erwarten, daß in diesem Schwellenbereich leicht spontane Sarkomeroszillationen auftreten bzw. die zur Auslösung von Oszillationen notwendige Koffeinkonzentration erniedrigt ist (vergl. Caputo et al., 1981; Lüttgau & Oetliker, 1968). Beide Vermutungen ließen sich jedoch nicht experimentell bestätigen.

Aus Messungen mit ionensensitiven Elektroden geht hervor, daß Koffein in einer Konzentration von 3 mM in Sartoriusmuskelpreparaten einen signifikanten Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 0,12 auf 0,31 μM (Lopez et al., 1983) verursacht. Mit der empfindlicheren "Aequorin"-Meßmethodik gelang es Konishi und Kurihara (1987), auch in Gegenwart niedrigerer Koffeinkonzentrationen (0,6 - 1,5 mM) eine Erhöhung der Ca^{2+} -Ruhekonzentration der Zelle nachzuweisen. Dieser Anstieg war nicht mit einer Kraftentwicklung korreliert und trat nicht mehr auf, wenn der Badlösung Hemmstoffe des Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzungsprozesses (z. B. Adenin und Procain) zugesetzt wurden. Konishi und Kurihara führten die Koffein-induzierte Zunahme der Zuckungskraft auf diese Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zurück. In gleicher Weise ließe sich mit dieser unterschwellig Erhöhung der Ca^{2+} -Ruhekonzentration auch eine unterschwellige Aktivierung der Skelettmuskelfaser erklären: Koffein induziert in geringer Konzentration (2 mM) eine unterschwellige Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, die zu einer Aktivierung einzelner Sarkomere in Form von Sarkomeroszillationen führt. Der zyklische Charakter dieser Freisetzung soll in Kap. 4.5 diskutiert werden.

Methylxanthine, die nicht in der 9-Position substituiert waren, induzierten konzentrationsabhängig in der intakten Skelettmuskelfaser Sarkomeroszillationen. Die höchste Effektivität wies dabei 1,7-Dimethylxanthin auf (0,5 mM), während sich mit 1-Methyl-3-isobutylxanthin erst in höheren Konzentrationen (≥ 3 mM) Oszillationen auslösen ließen. 1,9-Dimethylxanthin war auch höher konzentriert (4 mM) unwirksam. Die hier erzielten Effekte stimmen mit der Wirkung von Methylxanthinen auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR enthäuteter Muskelfasern (Miller & Thieleczek, 1977) und auf die Potenzierung der Zuckungskraft in intakten Fasern (Howell, Jones & Mayor, 1981) überein. Chapman und Miller (1974) folgerten aus Untersuchungen an Herzmuskelzellen, daß für die Aktivität der Substanzklasse ein doppelt-gebundenes N-Atom in der 9-Position des Xanthingerüsts

notwendig sei. Einzelne Ringkomponenten des Xanthinmoleküls zeigen jedoch ebenfalls eine Koffein-ähnliche Wirkung. 1,3-Dimethyluracil (60 mM) und Imidazol (50 mM) verstärken in intakten Skelettmuskelfasern die Zuckungskraft und lösen in höheren Konzentrationen (100 mM) Kontraktionen aus (Howell et al., 1981). Die Ergebnisse machen deutlich, daß sich die Aktivität der Methylxanthine zumindest nicht allein auf eine Doppelbindung zwischen der 8- und 9-Position zurückführen läßt.

Die verschiedenen Methylxanthine haben sehr unterschiedliche Wirkungen als Phosphodiesterasehemmer (Beavo, Rogers, Crofford, Baird, Hardman, Sutherland & Newman, 1971). Möglicherweise sind die gleichen Bauelemente der Moleküle einerseits für die Hemmung des Phosphodiesteraseenzyms und andererseits für eine Kontraktionsauslösung verantwortlich (Chapman & Miller, 1974), so daß sich die Wirkung der Methylxanthine auch im Skelettmuskel über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels erklären ließe. Die Wirkung von cAMP erwies sich hingegen als negativ: cAMP, das als membranpermeables Dibutyryl-cAMP eingesetzt wurde, induzierte in Konzentrationen bis zu 5 mM keine Sarkomeroszillationen. Zyklisches AMP hat ebenfalls keinen Einfluß auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR enthäuteter Muskelfasern (Thieleczek, 1982). Die Ergebnisse bestätigen die Schlußfolgerung von Chapman und Miller (1974), daß Methylxanthine direkt Ca^{2+} aus dem SR freisetzen und nicht über einen cAMP-abhängigen Mechanismus wirken.

4.2 Pharmakologische Beeinflussung Koffein-induzierter Sarkomeroszillationen

Wie in Kapitel (4.1) gezeigt wurde, ist der Wirkungsmechanismus, welcher der oszillatorischen Aktivität zugrunde liegt, nicht im T-tubulären System, sondern weiter intrazellulär, entweder in der Kopplungsstruktur zwischen T-System und sarko-

plasmatischem Retikulum oder am SR selbst lokalisiert. Um diese Schlußfolgerung abzusichern, wurden verschiedene Pharmaka getestet, die in unterschiedliche Prozesse der potential- und Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR eingreifen.

Der Ca^{2+} -Antagonist D-600 induziert in der Skelettmuskelfaser den Zustand der "Paralyse" (Eisenberg et al., 1983): Bei tiefen Temperaturen ($\leq 7^\circ\text{C}$) antwortet eine Muskelfaser in Gegenwart von D-600 auf eine Depolarisation mit einer normalen phasischen Kontraktur. Erneute Depolarisationsschritte bleiben ohne eine mechanische Antwort ("Paralyse": s. a. Kap. 3.1.6). Diese Entkopplung von T-System und SR-Membran kann durch eine Erhöhung der Temperatur (Eisenberg et al., 1983) oder durch eine Hyperpolarisation der Membran auf Potentialwerte zwischen -120 und -150 mV (Berwe et al., 1987) aufgehoben werden. Berwe et al. (1987) erklären die potentialabhängige Entkopplung über eine Bindung des Moleküls an einen Rezeptor im T-Tubulus (sog. "Potentialsensor"), der nach Vorstellung der Autoren eine hohe Affinität im depolarisierten Zustand und eine geringe bei negativeren Potentialen aufweist. Eisenberg et al. (1983) schließen ebenfalls eine Bindung an die Kopplungsstruktur zwischen T-System und den Terminalzisternen des SR's nicht aus. Die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung hingegen wird von D-600 nicht beeinflusst (Eisenberg et al., 1983). Dieser Befund konnte im Hinblick auf das Koffein-induzierte Auftreten der Sarkomeroszillationen bestätigt werden. In Gegenwart von D-600 (30 μM) war im paralyisierten Zustand weder eine Veränderung der Frequenz oder der Amplitude der Oszillationen zu verzeichnen noch mußte die zur Auslösung von Oszillationen notwendige Koffeinkonzentration (2 mM) erhöht werden. Allen et al. (1984) konnten an Herzmuskelzellen zeigen, daß D-600 ebenfalls keinen Einfluß auf die intrazellulären, SR-gesteuerten Ca^{2+} -Oszillationen hat. Das Ergebnis stützt die Schlußfolgerung aus den Versuchen zur Potentialabhängigkeit der Sarkomeroszillationen, daß der den Oszillationen zugrunde liegende Mechanismus nicht an der äußeren Zellmembran bzw. am T-tubulären System angreift.

Pharmaka, von denen bekannt ist, daß sie direkt die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verändern, wirken dagegen hemmend auf die Sarkomeroszillationen.

Dantrolen übt keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die elektrischen Eigenschaften (Kapazität, Widerstand, Ruhe- und Aktionspotential) der Oberflächenmembran aus. Da jedoch die depolarisationsinduzierte Kraftentwicklung durch Dantrolen gehemmt wird, nimmt man u. a. eine Beeinflussung des Kopplungsmechanismus' zwischen T-System und SR-Membran an (s. a. Danko et al., 1985). Andererseits zeigen Studien an isolierten SR-Vesikeln, daß sowohl die spontane als auch die Koffein-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (Van Winkle, 1976; Danko et al., 1985) durch Dantrolen gehemmt werden.

In Gegenwart von $12 \mu\text{M}$ Dantrolen war auch in der intakten Skelettmuskelfaser keine oszillatorische Aktivität mehr auslösbar. Die verwendete Dantrolenkonzentration liegt in dem Bereich, in dem auch eine signifikante Abnahme des Ca^{2+} -Effluxes aus dem SR zu beobachten ist (Danko et al., 1985). Die Hemmung der Sarkomeroszillationen konnte über eine Erhöhung der Koffeinkonzentration von 2 auf 4 mM bzw. der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 auf 10 mM kompensiert werden. Eine Aufhebung der blockierenden Wirkung von Dantrolen läßt sich über eine kompetitive Verdrängung des Moleküls durch Koffein von Bindungsstellen am sarkoplasmatischen Retikulum erklären. Entsprechende Dantrolen-Bindungsstellen mit hoher Affinität ($K_d = 5 \text{ nM}$) wurden von Sengupta, Meyer und Carafoli (1980) in isolierten SR-Vesikeln nachgewiesen. Danko et al. (1985) zeigten, daß die Hemmung der Koffein-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus SR-Vesikeln partiell aufgehoben wird, wenn die extravasikuläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht wird. Ein ähnlicher Mechanismus ließe sich für eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der intakten Muskelfaser annehmen. Sie bedingt eine geringfügige Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Ruhekonzentration (vergl. Lopez et al., 1983), die über einen noch unverstandenen Schritt dem hemmenden Effekt von Dantrolen entgegenwirkt.

Da eine Dantrolen-bedingte Blockierung der Ca^{2+} -Aufnahme ins

SR und der ATPase-Aktivität nahezu auszuschließen ist (Ohnishi, Taylor & Gronert, 1983; White, Collins & Denborough, 1983), werden offensichtlich der Mechanismus der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und damit verbunden die Sarkomeroszillationen durch Dantrolen gehemmt.

Die Wirkungsweise von Ryanodin auf den Muskel hängt von verschiedenen Faktoren wie Muskeltypus, Versuchsbedingungen, Höhe der verwendeten Ryanodinkonzentration und weiteren Parametern ab (Jenden & Fairhurst, 1969; Sutko, Ito & Kenyon, 1985). Während die Substanz im Skelettmuskel irreversible Kontrakturen auslöst, ist in Herzmuskelpräparaten eine Abnahme bzw. Verlangsamung der Kraftentwicklung zu verzeichnen.

Die Beeinflussung oszillatorischer Phänomene durch Ryanodin wurde bisher eingehend in Herzmuskelzellen untersucht (Allen et al., 1984; Fabiato, 1985b; Lakatta et al., 1985; Lundblad, Gonzales-Serratos, Inesi, Swanson & Paolini, 1986). Ryanodin hemmt sowohl spontane oszillatorische Phänomene wie auch zyklische Ca^{2+} -Fluktuationen, die durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervorgerufen werden bzw. als Folge einer Kontraktion auftreten. Untersuchungen von Lundblad et al. (1986) ergaben, daß mit einer Hemmung der Oszillationen keine Blockierung der Ca^{2+} -Aufnahme ins SR einhergeht. Im allgemeinen wird die Wirkung von Ryanodin auf eine Abnahme der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zurückgeführt (Sutko & Willerson, 1980).

Ähnlich wie in Herzmuskelzellen hemmte Ryanodin in einer vergleichbaren Konzentration (2 μM) auch die Koffein-induzierten Sarkomeroszillationen im Skelettmuskel. Diese Hemmung läßt sich jedoch nicht auf den gleichen Mechanismus zurückführen. Bianchi (1968) führte die kontrakturauslösende Wirkung von Ryanodin am Skelettmuskel zunächst auf eine Hemmung der aktiven Aufnahme von Ca^{2+} ins sarkoplasmatische Retikulum zurück. Neuere biochemische Untersuchungen ergaben hingegen, daß die hemmende Wirkung von Ryanodin (1 μM) auf den energieabhängigen Transport von Ca^{2+} ins SR (Feher & Lipford, 1985) nur schwach ausgeprägt ist. Offensichtlich ist eine ständige, Ryanodin-in-

duzierte Öffnung des Ca^{2+} -Kanals in den Terminalzisternen, wie sie von Meissner (1986) nachgewiesen wurde, für die beobachteten Ryanodineffekte verantwortlich. Die Untersuchungen von Meissner und Mitarbeitern sind für die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von Bedeutung, da die Messungen an einem isolierten System, dem SR-Kanal, durchgeführt wurden. Einflüsse anderer Zellstrukturen, welche die Interpretation der Versuchsergebnisse oft erschweren, scheiden somit aus. Ryanodin hält den Ca^{2+} -Kanal in einer permanent offenen Stellung, so daß ständig Calciumionen freigesetzt werden können. Eine zyklische Ca^{2+} -Freisetzung, wie sie für die Sarkomeroszillationen postuliert wird, kann bei einem kontinuierlichen Ca^{2+} -Efflux aus dem SR nicht mehr gewährleistet werden. Interessant ist ebenfalls, daß die Wirkung auf den Ca^{2+} -Kanal erst nach einer Latenzzeit von 20 Minuten voll ausgeprägt war (Meissner, 1986). Diese Latenzzeit wurde bereits von Bianchi (1968) für die kontrakturauslösende Wirkung von Ryanodin beschrieben und konnte auch für die Hemmung der Sarkomeroszillationen bestätigt werden.

4.3 Ca^{2+} - und Koffein-induzierte Sarkomer- und Spannungsozillationen in enthäuteten Skelettmuskelfasern

Die eigenen Untersuchungen zur Wirkung von Koffein auf die oszillatorische Aktivität der enthäuteten Faser bestätigte die aus anderen Experimenten bekannte Abhängigkeit der Koffeinwirkung von der freien Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung (Endo, 1975, 1977; Endo et al., 1970). Koffein verursachte in einer Konzentration von ≥ 5 mM in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen repetitive Kontraktionen. Wurde die zur Auslösung von Sarkomeroszillationen in der intakten Skelettmuskelfaser übliche Koffeinkonzentration (2 mM) auf die enthäutete Faser appliziert, war eine unterschwellige Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung ($\text{pCa} = 6,1$) für eine oszillatorische Kraftentwicklung

notwendig. In Lösungssystemen mit einer erniedrigten freien Mg^{2+} -Konzentration (0,1 mM), in denen die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR erleichtert ist (Stephenson, 1981a), ließen sich sowohl zyklische Spannungstransienten wie auch unterschwellige Sarkomeroszillationen allein durch Ca^{2+} induzieren. Bei einem pCa-Wert von 6,1 und einer Pufferung der Badlösung mit einer freien EGTA-Konzentration von 0,5 mM war ein Zustand erreicht, bei dem keine meßbare Spannungsentwicklung, dagegen aber eine unterschwellige Aktivierung der Skelettmuskelfaser in Form von Sarkomeroszillationen zu beobachten war.

Sowohl für Herz- als auch für Skelettmuskelzellen wurden zwei verschiedene Oszillationstypen beschrieben, die von unterschiedlichen Zellstrukturen reguliert werden: die SR-gesteuerten und die myofilamentären Oszillationen (vergl. Kap. 1.1 u. 1.2). Insbesondere zwei Versuchsergebnisse machen deutlich, daß die hier beschriebenen oszillatorischen Phänomene über einen Mechanismus gesteuert werden, der am sarkoplasmatischen Retikulum angreift:

1. In Lösungen mit einer hohen Pufferkapazität für Ca^{2+} blieb die oszillatorische Aktivität aus. Myofilamentäre Spannungsozillationen wurden dagegen auch in Lösungssystemen beobachtet, die bis zu 50 mM des Ca^{2+} -Chelators EGTA enthielten (Fabiato & Fabiato, 1978b).
2. In Präparaten, deren SR-Membranen durch eine Detergenzienbehandlung zerstört waren, ließen sich weder Spannungs- noch Sarkomeroszillationen induzieren. Das Ergebnis schließt gleichzeitig aus, daß andere intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher wie die Mitochondrien einen Einfluß auf die oszillatorische Aktivität nehmen.

Erste Untersuchungen von Endo et al. (1970) über die Wirkung von Koffein an der enthäuteten Faser legten nahe, daß Koffein nicht über einen unabhängigen Wirkungsmechanismus verfügt, sondern in die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR eingreift. Nach Studien von Stephenson (1981a, 1981b) ist Koffein in den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus in-

volviert, indem es unabhängig von Ca^{2+} einen geringen Ca^{2+} -Efflux aus dem SR induziert, der sekundär durch Calciumionen verstärkt wird. Um die enge Verbindung zwischen der Ca^{2+} - und Koffein-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung zu demonstrieren, postuliert Stephenson (1981b) in einem Minimalmodell einen gemeinsamen Ca^{2+} -Kanal für den Koffein- und Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Efflux (s. Abb. 4.1). Zwei Rezeptoren in der SR-Membran kontrollieren das Öffnen und Schließen des Kanals. Der Koffein-Rezeptor (R1) ist am luminalen Ende des Kanals lokalisiert und stellt somit keinen Sensor für eine Ca^{2+} -Veränderung im myofilamentären Raum (MFS) dar. Ein zweiter Ca^{2+} -Rezeptor (R2) ist zum myofilamentären Raum orientiert. Eine Aktivierung von R1 durch Koffein würde einen ersten Öffnungszustand des Kanals und einen geringen Ca^{2+} -Efflux aus dem SR induzieren. Dieser Ca^{2+} -Ausstrom aktiviert seinerseits nach Vorstellung der Autorin den Ca^{2+} -Rezeptor, der eine "vollständige" Öffnung des Kanals einleitet. In Abwesenheit von Koffein führt eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration unmittelbar über den Ca^{2+} -Rezeptor zu einer Öffnung des Kanals.

Elektrophysiologische Messungen am isolierten SR-Kanal (Smith, Coronado & Meissner, 1986) stützen diese Modellvorstellung. Die Untersuchungen ergaben, daß sowohl Calciumionen (Smith et al., 1986) als auch Koffein (Meissner, persönliche Mitteilung) den Ca^{2+} -Kanal in der SR-Membran zu öffnen vermögen. Es ist somit wahrscheinlich, daß die oszillatorische Aktivität ebenfalls durch eine zyklische Ca^{2+} - und Koffein-induzierte Öffnung dieses Kanals hervorgerufen wird.

Das Ca^{2+} -induzierte Auftreten von Sarkomeroszillationen in enthäuteten Fasern weist auf ein Schwellenphänomen der potentialunabhängigen Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung hin. Ca^{2+} induzierte, wie zuvor dargestellt, in einer Konzentration von 8×10^{-7} M. in Abhängigkeit von der Konzentration des Ca^{2+} -Chelators EGTA überschwellige Kraft- bzw. unterschwellige Oszillationen einzelner Sarkomere. Die Sarkomeroszillationen repräsentieren somit einen Prozeß der Ca^{2+} -Freisetzung, der an der Schwelle zur Kraftentwicklung liegt und möglicherweise auch

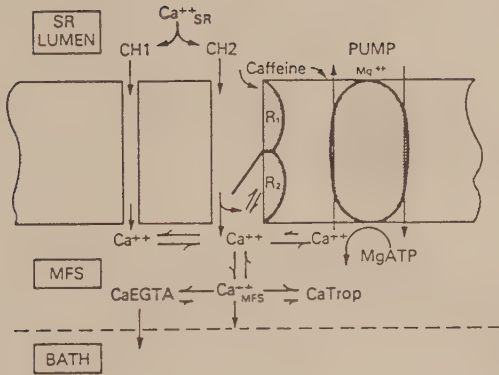


Abb. 4.1

Schematische Darstellung eines hypothetischen gemeinsamen Ca^{2+} -Kanals in der SR-Membran für den Koffein- und den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Efflux (aus: Stephenson, 1981b)

Die Öffnung des Ca^{2+} -Kanals (CH2) wird durch einen Koffein-Rezeptor (R_1) und einen Ca^{2+} -Rezeptor (R_2) gesteuert. Interaktionen mit einem potentiellen Ca^{2+} -„leak channel“ (CH1), dem aktiven Ca^{2+} -Transportsystem (Pump) in der SR-Membran und Ca^{2+} -Bindungsstellen (u. a. Trop = Troponin C) im myofilamentären Raum (MFS) sind angedeutet. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

für die physiologische Aktivierung der Skelettmuskelfaser von Bedeutung ist.

4.4 Freisetzung und Aufreinigung eines die Muskelfaser aktivierenden endogenen Modulators

Die Entdeckung eines niedermolekularen Materials in der Badlösung oszillierender Muskeln (Kumbaraci & Nastuk, 1982) war insbesondere unter dem Aspekt interessant, daß dieses Material einerseits vom Skelettmuskel freigesetzt wurde und andererseits den Skelettmuskel wiederum selbst aktivierte. Den Autoren gelang eine erste Charakterisierung des Materials, indem sie es aus der Badlösung isolierten, photometrisch das Absorptionsmaximum bestimmten und aufgrund von Dialyseexperimenten bzw. über die Gelchromatographie eine grobe Abschätzung des Molekulargewichts vornahmen.

Ziel dieser Arbeit war es, das vom oszillierenden Muskel freigesetzte Material einer Substanzklasse zuzuordnen und seine Aktivität an der isolierten Skelettmuskelfaser zu testen.

Zur Auftrennung des freigesetzten Materials wurde die "reversed phase"-HPLC verwendet. Das Chromatographieverfahren wird vielfach zur Aufreinigung von Neuropeptiden aus komplexem biologischem Material genutzt (vergl. Moore, 1982; Dawson, Steves, Lorden & Oparil, 1985). Auch für die hier beschriebene Aufreinigung erwies sich dieses Chromatographiesystem als adäquat. Da sich die verwendeten Laufmittel aus leicht flüchtigen Stoffen zusammensetzten, ließen sie sich leicht aus den Aktivierungslösungen entfernen. Störende Salze in den Lösungen zur Aktivitätsmessung, wie sie u. a. aus der Ionenaustauschchromatographie resultieren, konnten somit vermieden werden.

Es wurde gezeigt, daß sich das freigesetzte Material aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt, von denen lediglich ei-

ne einzige aktiv ist. Die Aminosäure-Analyse ergab, daß die aktive Komponente Peptidmaterial enthält. Unter der Voraussetzung, daß das Material sauber ist, setzt sich die Substanz aus 20 - 21 Aminosäuren oder einem Vielfachen dieser Zahl zusammen, wobei die Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Serin anteilmäßig dominieren. Da das Material nur ein einziges Absorptionsmaximum bei 215 nm aufweist, handelt es sich im Falle eines Substanzgemisches wahrscheinlich um strukturell verwandte Stoffe, d. h. um Peptide. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß andere Stoffe mit ähnlichen Absorptionsspektren in einem potentiellen Substanzgemisch enthalten sind. Geht man von 21 Aminosäuren aus, fällt das Peptid mit einem Molekulargewicht von minimal 2400 g/mol in die Größenordnung vieler Neuropeptide, die eine vielfältige Rolle in der rezeptorvermittelten Aktivierung der glatten Muskulatur spielen.

Im Gegensatz zu Untersuchungen von Kumbaraci und Nastuk (1982) war eine Vorinkubation der Präparate in Koffein-haltiger Badlösung für die Auslösung der Aktivität nicht notwendig. Die aktive Komponente induzierte in der intakten Skelettmuskelfaser kleine und im Vergleich zu Koffein-induzierten Oszillationen langsame Sarkomeroszillationen. Wesentlich stärker ausgeprägt war die Aktivität in der enthäuteten Faser, so daß der Wirkort der Substanz intrazellulär angenommen werden kann. In Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Pufferung des intrazellulären Systems induzierte das Material sowohl unterschwellige Sarkomeroszillationen als auch eine zyklische Kraftentwicklung. Die Frage, wie man sich die Wirkung der Substanz innerhalb des Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus' vorstellen kann, wird in Kap. 4.5 behandelt.

Peptide gehören zur Klasse der membranimpermeablen Substanzen, so daß eine Diffusion der vom oszillierenden Muskel produzierten Substanz entlang eines Konzentrationsgradienten vom Zellinneren in die Badlösung unwahrscheinlich ist. Über die Art des Freisetzungsmechanismus' läßt sich an dieser Stelle nur spekulieren. Ein verbreiteter Transportmechanismus für Neuro-

peptide über Membranen ist die vesikuläre Freisetzung (vergl. Turner, 1986). In jüngster Zeit wurden jedoch auch nicht-vesikuläre Transportmechanismen auch für größere Proteine bekannt (s. a. Zimmermann & Meyer, 1986). Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die "Signalhypothese", nach der die Translokation eines Proteins über die Membran durch eine Bindung einer charakteristischen Aminosäuresequenz ("Signalpeptid") an spezifische Strukturen innerhalb der Membranen eingeleitet wird (Wickner & Lodish, 1985).

Ein großer Teil der bekannten aktiven Peptide entsteht als Proteolyseprodukt größerer Peptidketten, sog. Prohormone. In vielen Fällen dient ein einziges, größeres Polypeptid als Vorstufe für verschiedene biologisch aktive Peptide, die unterschiedlichste Funktionen ausüben (Martinez & Potier, 1986). Interessant ist auf dem Gebiet der Muskelphysiologie ein von Vorhofzellen des Säugerherzens produziertes Peptidhormon, der "atrial natriuretic factor" (ANF: De Bold, 1985; Needleman, 1986). Das Prohormon des ANF ist ein aus 126 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das aus Homogenisaten von Vorhofzellen bzw. isolierten Granulae isoliert wurde. Es geht aus einem Praeprohormon mit 151 - 152 Aminosäureresten durch Abspaltung einer Signalsequenz (s. o.) hervor. Die zirkulierende Form des ANF ist ein Peptid aus 28 Aminosäuren, das die Aminosäurereste 123 - 151 des Praeprohormons umfaßt. Da dieses Peptid die Hauptform ist, die aus Perfusaten von Vorhofzellen isoliert werden kann, wird das Prohormon wahrscheinlich schon vor der Freisetzung in die zirkulierende Form überführt.

Die oft beobachtete Abspaltung kleinerer Peptide aus höher molekulären Vorstufen wirft die Frage auf, ob das vom oszillierenden Muskel freigesetzte Peptid ebenfalls ein Proteolyseprodukt eines größeren Proteins ist. Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche lassen eine eindeutige Beantwortung dieser Frage nicht zu. Es kann lediglich die Schlußfolgerung gezogen werden, daß dieses isolierte Peptid, appliziert auf den Skelettmuskel, in den Mechanismus der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Frei-

setzung eingreift. Ein Zusammenwirken mit Enzymen oder Enzymsystemen ist dabei wahrscheinlich.

4.5 Modell zur zyklischen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum unter Einbeziehung einer Modulatorsubstanz

Sowohl die Koffein-induzierten Sarkomeroszillationen in intakten Skelettmuskelfasern wie auch die Ca^{2+} - und Koffein-induzierten Oszillationen in enthäuteten Fasern lassen sich, wie in den vorausgegangenen Kapiteln dargestellt wurde, auf eine zyklische Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zurückführen. In Herzmuskelzellen wurden diese zyklischen Ca^{2+} -Fluktuationen direkt mit dem Ca^{2+} -sensitiven Photoprotein Aequorin u. a. von Allen et al. (1984) nachgewiesen. Die Autoren fordern für die repetitive Ca^{2+} -Freisetzung, daß ein bestimmter Ca^{2+} -Ladungszustand des SR's erreicht werden muß. Wird diese Ladungsschwelle überschritten, erfolgt eine erneute Ca^{2+} -Freisetzung. Wie kann man sich einen derartigen zyklischen Prozeß im einzelnen vorstellen?

Da sich keine Anhaltspunkte für ein potentialinduziertes Auftreten der Oszillationen ergaben, wird der Prozeß im Rahmen des Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus' diskutiert (s. Abb. 4.2). Eine geringe Menge Ca^{2+} induziert einen Efflux von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Das freigesetzte Ca^{2+} diffundiert rasch zu den kontraktilen Proteinen; die Bindung von Ca^{2+} an das Regulatorprotein Troponin C (TNC) löst den Sperrmechanismus zwischen Actin- und Myosinfilamenten und leitet die Gleitbewegung der Myofilamente ein. Nach Vorstellung von Fabiato (1983) führt die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration gleichzeitig zu einer Schließung des Ca^{2+} -Kanals der SR-Membran. Ungeklärt ist zur Zeit jedoch noch der molekulare Mechanismus, der eine solche konzentrationsabhängige Aktivierung und Deaktivierung des Kanals durch das gleiche

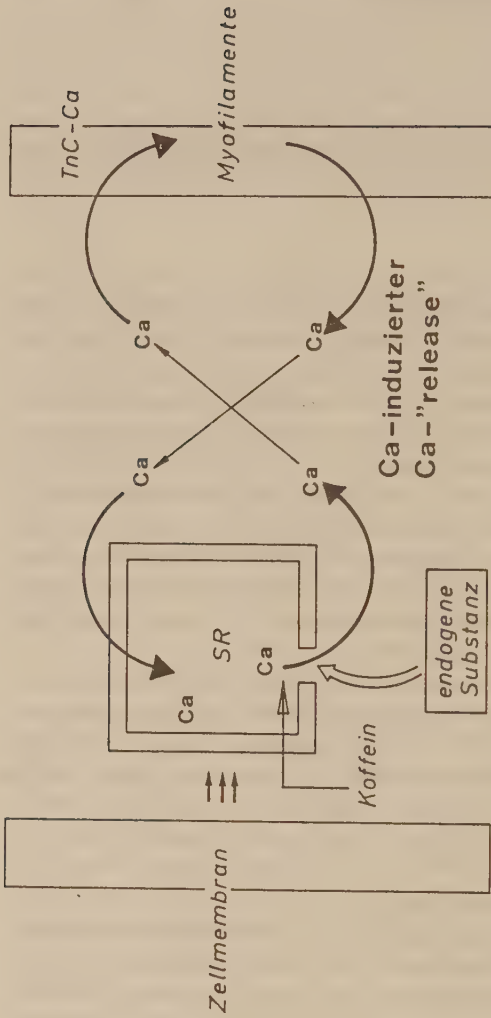


Abb. 4.2

Modell zur zyklischen Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum

Beschreibung s. Text

Ion ermöglicht. Die Reakkumulation des freigesetzten Ca^{2+} ins SR durch die Ca^{2+} -Transport-ATPase in der SR-Membran führt zu einer Erniedrigung der filamentären Ca^{2+} -Konzentration, es resultiert eine Dissoziation der Calciumionen von den Regulatorproteinen und eine Sperre der Filamentinteraktion. Erreicht das sarkoplasmatische Retikulum eine bestimmte Ladungsschwelle, wird eine erneute Ca^{2+} -Freisetzung initiiert und der Zyklus beginnt von neuem.

Koffein hat einen ähnlichen Effekt wie Calciumionen. Wie Ca^{2+} vermag es den SR-Kanal zu öffnen (Meissner, persönliche Mitteilung), indem es an einen Koffein-Rezeptor im Lumen des SR-Kanals bindet (Stephenson, 1981b).

Welche Funktion nimmt ein aus dem oszillierenden Muskel freigesetztes Peptid in diesem Prozeß ein? Aufgrund der im Vergleich zur intakten Muskelfaser deutlich stärkeren Aktivität der Substanz in der enthäuteten Faser ist der Wirkort im Skelettmuskel intrazellulär anzunehmen. Ähnlich wie Ca^{2+} und Koffein induzierte das aktive Material bei einer schwachen Ca^{2+} -Pufferung des Lösungssystems durch EGTA überschwellige Spannungsozillationen in der enthäuteten Faser. Wurde die freie EGTA-Konzentration geringfügig erhöht, waren nur noch unterschwellige Sarkomeroszillationen zu verzeichnen. Nach Zerstörung der SR-Membranen traten beide Oszillationstypen nicht mehr auf, so daß auch in diesem Fall das SR die Oszillationen steuerte. Die Freisetzungslösungen, in denen die Aktivität der Substanz an der enthäuteten Faser getestet wurde, wiesen stets eine Ca^{2+} -Kontamination auf, die knapp unter der Schwellenkonzentration lag, die zur mechanischen Kraftentwicklung notwendig war. Aufgrund der Parallelität zur Koffein- und Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung ist daher anzunehmen, daß die Substanz eine modulierende Wirkung auf den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Efflux aus dem SR ausübt: Ein Ca^{2+} -Stimulus ist zunächst für eine Freisetzung einer geringen Menge an Ca^{2+} notwendig, dieser wird jedoch sekundär durch Einwirken der Substanz verstärkt. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß die Substanz phosphorylierbar ist. Möglicherweise sind in dem dar-

gestellten Prozeß Phosphorylierungsschritte involviert, die wiederum eine Verbindung zu anderen Regulationswegen in der Zelle aufzeigen.

Im Gegensatz zu Ergebnissen aus Untersuchungen an Herzmuskelzellen waren in intakten Skelettmuskelfasern nur unterschwellige Sarkomeroszillationen und keine zyklischen Spannungstransienten zu verzeichnen, wie sie in enthäuteten Fasern induziert werden konnten. Wenn sich die oszillatorische Aktivität auch nicht potentialabhängig auslösen läßt, so bleibt zu diskutieren, ob eine Struktur innerhalb des T-Tubulus eine regulative Funktion ausübt, indem sie eine zyklische überschwellige Aktivierung verhindert. Fabiato und Baumgarten (1984) diskutieren im Herzmuskel den Na^+ - Ca^{2+} -Austausch über dem Sarkolemma als potentiellen Faktor, der unter physiologischen Bedingungen eine zyklische Ca^{2+} -Freisetzung verhindert. Im Skelettmuskel wäre der in der T-tubulären Membran lokalisierte "Potentialsensor" eine mögliche Struktur mit einer solchen regulativen Funktion.

Während für den Herzmuskel ein Ca^{2+} -sensitiver Ca^{2+} - "release"- Mechanismus in der SR-Membran an der elektro-mechanischen Kopplung nahezu unumstritten ist, wird dessen physiologische Bedeutung für den Skelettmuskel kontrovers diskutiert. Die für eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR benötigte freie Ca^{2+} -Konzentration im myofibrillären Raum ist nach Endo (1977) zu hoch, als daß sie im lebenden Muskel im Intrazellulär- bzw. Spalt- raum zwischen T-Tubulus und SR-Membran während der Aktivierung erreicht würde. Stephenson (1981a) wendet dagegen ein, daß wahrscheinlich die lokale Ca^{2+} -Konzentration an der SR-Oberfläche und nicht die nominelle freie Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung eine entscheidende Rolle spielt. Die entsprechenden Oberflächenkonzentrationen können sich nach Berechnungen verschiedener Autoren (Moiescu & Thieleczek, 1978; Thieleczek, 1982) durchaus einstellen. Unter diesem Gesichtspunkt ist eine partielle physiologische Bedeutung dieses Mechanismus' auch im

Prozeß der elektro-mechanischen Kopplung des Skelettmuskels nicht auszuschließen.

4.6 Die physiologische Bedeutung des vom oszillierenden Muskel freigesetzten Materials - Ansatzpunkte für weiterführende Experimente

Weitgehend unverstanden ist bisher der Schritt im Prozeß der elektro-mechanischen Kopplung, der die Depolarisation der T-Tubulus-Membran mit der Ca^{2+} -Freisetzung aus den Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Retikulums verbindet. Verschiedene Mechanismen wurden für diesen Prozeß postuliert (vergl. Mathias, Levis & Eisenberg, 1980). In diesem Zusammenhang wird zur Zeit die Rolle einer chemischen Transmittersubstanz (Inositoltrisphosphat) diskutiert, deren Ca^{2+} -freisetzende Wirkung aus subzellulären Komponenten in Geweben unterschiedlichster Herkunft nachgewiesen wurde. Die Bildung dieser Substanz erfolgt so schnell, daß sie auch für die physiologische Aktivierung des Skelettmuskels von Bedeutung sein könnte. Die Forschergruppen, welche die Aktivität dieser Substanz an Skelettmuskelzellen untersucht haben, kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während einige Arbeitsgruppen die Ca^{2+} -freisetzende Wirkung an isolierten SR-Fraktionen (Volpe, Salviati, Di Virgilio & Pozzan, 1985) und enthäuteten Skelettmuskelfasern (Vergara, Tsien & Delay, 1985) nachwiesen, konnten diese Ergebnisse in anderen Laboratorien unter vergleichbaren Versuchsbedingungen nicht bestätigt werden (Ashley, Griffiths, Lea & Tregear, 1985; Scherer & Ferguson, 1985; Thieleczek & Heilmeyer, 1986).

Es stellt sich die Frage, ob die Bedeutung des vom oszillierenden Muskel freigesetzten Peptids ebenfalls in diesem Zusammenhang zu diskutieren ist. Eine Verstärkung oder potentielle Auslösung des Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Effluxes aus dem SR konnte

in dieser Arbeit indirekt nachgewiesen werden. Möglicherweise stellt diese Substanz auch in vivo einen potentiellen Modulator des Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzungsmechanismus' aus dem sarkoplasmatischen Retikulum dar. Es bleibt die Frage offen, ob oder in welcher Weise sie eine vermittelnde Funktion bei der Übertragung des elektrischen Signals von den T-Tubuli auf die Membranen des SR's ausübt.

Der Befund, daß diese Substanz vom Muskel freigesetzt wird, wirft die Frage nach einem Wirkort außerhalb des Skelettmuskels auf. Von Bedeutung auf dem Gebiet der Muskelphysiologie ist das zuvor beschriebene Polypeptidhormon ANF, das von Vorhofzellen des Säugerherzens gebildet und in die Blutbahn freigesetzt wird. Das Peptid hat diuretische und hypotensive Wirkung und zeigt einen hemmenden Effekt auf die Renin- und Aldosteronsekretion (vergl. De Bold, 1985). Eine Wirkung auch des vom Skelettmuskel freigesetzten Peptids auf andere Gewebe (z. B. Herz- und glatte Muskulatur) kann aufgrund der bisher durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Substanz weitgehend aufgereinigt und ihr Wirkort im Skelettmuskel lokalisiert werden. In zukünftigen Experimenten gilt es, die Frage nach dem physiologischen Wirkort zu klären. Voraussetzung für diese Untersuchungen oder zumindest von Vorteil sind genauere Kenntnisse über die Struktur der Substanz. Nach einer erneuten Überprüfung der Reinheit des Materials bietet sich für weitere Strukturuntersuchungen die Aminosäure-Sequenzanalyse an. In diesem Zusammenhang könnte eine Identifizierung der phosphorylierten Aminosäurereste erfolgen, wobei als mögliches Verfahren die von Meyer (1987) entwickelte Methode zur Identifizierung von phosphorylierten Serinresten zu diskutieren ist. Um die Frage nach dem physiologischen Wirkort zu klären, sollte die Aktivität der Substanz auch an anderen Geweben wie Herzmuskelzellen oder glatten Muskelzellen überprüft werden. Für weitere Strukturuntersuchungen und Aktivitätsmessungen wäre es jedoch von Vorteil, mehr Material dieser aktiven Substanz zur Verfügung zu haben. Es ist zu überprüfen, ob das aktive Peptid

in der Form, wie es vom oszillierenden Muskel freigesetzt wird, bereits intrazellulär im Muskel vorliegt. Als mögliches Verfahren zur Isolierung einer größeren Menge dieser Substanz böte sich dann die Homogenisation von Muskelpräparaten an.

5. A N H A N G

5.1 Die quergestreifte Muskelfaser als dreidimensionales Beugungsgitter

Eine einzelne quergestreifte Muskelfaser wirkt aufgrund der Periodizität ihrer anisotropen (A-) und isotropen (I-) Banden annähernd wie ein eindimensionales Beugungsgitter (Sandow, 1936). Verschiedene Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch gezeigt, daß Volumeneffekte der zylindrischen Muskelfaser für verschiedene Beugungsphänomene berücksichtigt werden müssen (vergl. Baskin, Roos & Yeh, 1979; Leung, 1984; Rüdél & Zite-Ferenczy, 1979; Yeh, Baskin, Lieber & Roos, 1980; Zite-Ferenczy et al., 1986). Die Autoren schlagen stattdessen eine dreidimensionale Betrachtungsweise für das Beugungsverhalten der Muskelfaser vor. Die zur mathematischen Beschreibung verwendeten Formalismen von Bragg (1913) und Ewald (1921) wurden dem Bereich der Kristallographie entnommen. Der Ewald-Formalismus liefert eine abstrakte, allgemeine Beschreibung des Beugungsprozesses: Die lichtbeugende Struktur, in diesem Fall die Muskelfaser, wird dabei als reziproker Gitterraum (Ewald-Konstruktion) dargestellt. Da sich die Beugungseigenschaften der Muskelfaser anschaulicher mit dem Bragg-Formalismus erklären lassen, soll dieser hier exemplarisch vorgestellt werden.

Wird eine einzelne Muskelfaser senkrecht zur Faserachse von einem monochromatischen Lichtstrahl illuminiert, so erhält man ein Beugungsspektrum mit den charakteristischen Beugungsmaxima 1. bis n-ter Ordnung links und rechts des ungebeugten Anteils des Lichtstrahls. Das Spektrum weist jedoch oft starke Asymmetrien bzgl. der Lichtintensität der linken und rechten Beugungslinien auf (Rüdél & Zite-Ferenczy; 1979, 1980). Messungen der Lichtintensitätsverteilung in den einzelnen Beugungsmaxima ergaben, daß sich diese Unterschiede anhand Bragg'scher Reflexionen des einfallenden Lichtes an Gitterstrukturen innerhalb

der Muskelfaser erklären lassen. Nach Vorstellung von Rüdell und Zite-Ferenczy (1979) werden diese Gitterebenen von Populationen einzelner Myofibrillen gebildet, die in einem bestimmten Winkel zur Richtung des einfallenden Lichtes geneigt sind. Dieser Winkel wird durch die Bragg'sche Reflexionsbedingung (s. u.) gegeben.

Abb. 5.1 zeigt schematisch einen Längsschnitt durch eine Skelettmuskelfaser in Ringerlösung, auf die ein monochromatischer Lichtstrahl senkrecht zur Faserachse gerichtet ist. Es ist nur eine Population von Gitterebenen dargestellt, die mit dem Winkel η zur Richtung des einfallenden Lichtes geneigt ist. Eine Reflexion an dieser Gitterebene erfolgt nur unter der Bedingung, wenn η gleich dem Bragg'schen Winkel θ ist, der durch die Bragg'sche Reflexionsbedingung gegeben ist:

$$(1) \quad 2d \cdot \sin\theta_k = \frac{k \cdot \lambda}{n_{\text{faser}}} \quad \text{mit } k = 1, 2, 3$$

d bezeichnet den kürzesten Abstand zweier Gitterebenen und λ/n_{faser} die Wellenlänge des einfallenden Lichtes in der Faser mit dem Brechungsindex $n_{\text{faser}} = 1,377$ (Huxley & Niedergerke, 1958).

Der Beugungswinkel des "reflektierten" Lichtstrahls beträgt 2θ (s. Bragg, 1913). Nach dem Gesetz zur Brechung des Lichtes gilt an der Grenzfläche Muskelfaser - Ringerlösung

$$(2.1) \quad \frac{\sin\beta}{\sin 2\theta} = \frac{n_{\text{faser}}}{n_{\text{Ringer}}}$$

und an der Grenzfläche Ringerlösung - Luft

$$(2.2) \quad \frac{\sin\alpha}{\sin\beta} = n_{\text{Ringer}} \cdot$$

β bezeichnet den Winkel des austretenden Lichtstrahls aus der Muskelfaser und α den Winkel des austretenden Lichtstrahls an der Grenzfläche Ringerlösung - Luft.

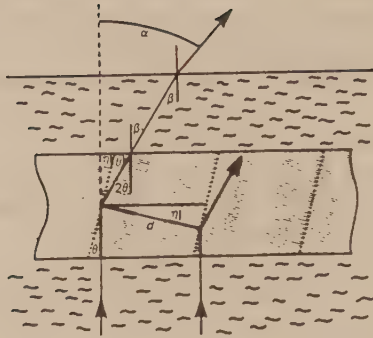


Abb. 5.1

Bragg'sche Reflexionen in der Skelettmuskelfaser

(aus: Rüdél & Zite-Ferenczy, 1979)

Die Abbildung zeigt schematisch einen Längsschnitt durch eine einzelne Skelettmuskelfaser, auf die senkrecht zur Faserachse ein monochromatischer Lichtstrahl gerichtet ist. Der Lichtstrahl wird an einer Gitterebene, die mit dem Winkel η zur Richtung des einfallenden Lichtes geneigt ist, "reflektiert". Die verwendeten Bezeichnungen sind dem Text zu entnehmen.

Aus den Gleichungen (2.1) und (2.2) folgt:

$$(3) \quad \frac{\sin \alpha}{\sin 2\theta} = n_{\text{faser}}$$

Die Sarkomerlänge SL berechnet sich aus dem Abstand zweier Gitterebenen d und dem Neigungswinkel η als $d = SL \cdot \cos \eta$. Mit $\sin \theta \cos \theta = 1/2 \cdot \sin 2\theta$ und $\eta = \theta$ ergibt sich aus Gleichung (1):

$$(4) \quad \sin 2\eta = \frac{k \cdot \lambda}{n_{\text{faser}} \cdot SL}$$

Setzt man Gleichung (3) in (4) ein, so ergibt sich wiederum die Formel zur Beugung des Lichtes an einem eindimensionalen Gitter (s. a. 2.3.1):

$$(5) \quad \sin \alpha = \frac{m \cdot \lambda}{SL}$$

Berücksichtigt man nur eine Population von Gitterebenen, wie in Abb. 5.1 dargestellt, wird der einfallende Lichtstrahl auch nur in eine Richtung "reflektiert", d. h. man erhält nur ein Beugungsmaximum zur rechten Seite (laut Abb. 5.1) des ungebeugten Anteil des Lichtstrahls. Um die Existenz einer weiteren Reflexion unter dem Winkel η zur linken Seite zu erklären, muß eine zweite Population von Gitterebenen mit dem Neigungswinkel $-\eta$ angenommen werden.

Die unterschiedlichen Neigungswinkel dieser Myofibrillenpopulationen (= Gitterebenen) in der Muskelfaser machen eine quantitative Auswertung des Beugungsspektrums oft problematisch. Bragg'sche Reflexionsphänomene sind in der Praxis insbesondere dann von Bedeutung, wenn in Aktivierungsexperimenten Lichtintensitätsänderungen in einzelnen Beugungsmaxima in Beziehung zur Kraftentwicklung gesetzt werden. Die gemessenen Änderungen der Lichtintensität sind abhängig von der Neigung reflektie-

render Gitterebenen und oft nicht zum Ausmaß der Kraftentwicklung proportional (Rüdel & Zite-Ferenczy, 1980).

5.2 Theoretische Grundlagen der statistischen Signalanalyse

Die rechnergestützte Analyse analoger Signale setzt grundlegende Kenntnisse von Aufbau und Struktur dieser Signale voraus. Die Abb. 5.2 gibt eine Übersicht über die Einteilung analoger Signale in unterschiedliche Signalklassen. Übergeordnet unterscheidet man determinierte und nicht-determinierte Signale. Während für determinierte Signale der Zeit- und Werteverlauf vorausberechnet werden kann, sind die letzteren im wesentlichen von statistischen Parametern bestimmt. In 2.3.2 wurde gezeigt, daß die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sarkomeroszillationen in die Klasse der nichtdeterminierten stochastischen Signale einzuordnen sind. Im folgenden seien nun die theoretischen Grundlagen zur statistischen Analyse derartiger Signale zusammenfassend beschrieben.

In der Praxis stehen zur Analyse eines Signals nicht unendlich viele Meßwerte, sondern in der Regel nur eine begrenzte Anzahl von Messungen zur Verfügung. Die für statistische Signalvorgänge über ein endliches Zeitintervall ermittelten Signalparameter können daher nur "Schätzwerte" bilden, die mehr oder weniger stark um den theoretischen Erwartungswert streuen. In der Statistik bezeichnet man eine derartige Beschränkung auf eine endliche Teilmenge aus einer Grundgesamtheit oder Gesamtheit als Stichprobenentnahme. Um Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Grundgesamtheit zu ziehen, bedient man sich sogenannter Schätzfunktionen.

Die Abweichung des Ergebnisses der Schätzfunktion von dem theoretischen Erwartungswert eines Signalparameters ist abhängig von der "Konsistenz" bzw. "Erwartungstreue" der Schätzfunktion. Die folgenden Definitionen sind Fisz (1966) ent-

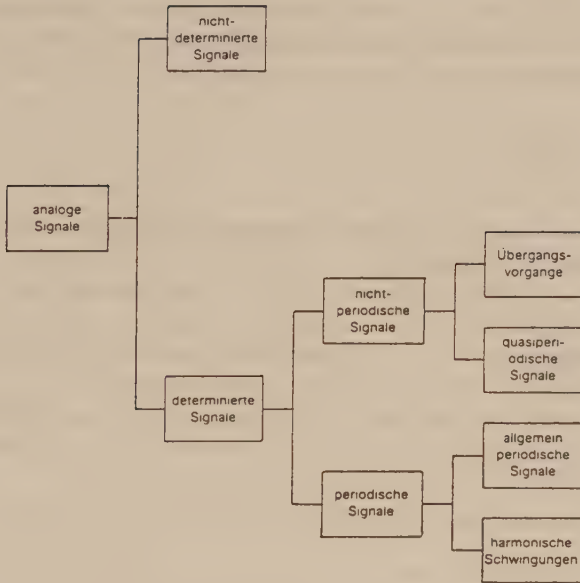


Abb. 5.2

Übersicht über verschiedene Signalklassen

nommen.

Definition 5.1:

Eine Schätzfunktion U_n des Parameters Q heißt konsistent für Q , wenn die Folge (U_n) stochastisch gegen den Parameterwert Q konvergiert:

$$\lim_{n \rightarrow \infty} P[(U_n - Q) > \epsilon] = 0 \quad \forall \epsilon > 0$$

Zur Definition 5.1 ist folgendes Korollar äquivalent (Oppenheim & Schafer, 1978):

Korollar 5.2:

Eine Schätzfunktion U_n ist konsistent, wenn die Varianz der Schätzfunktion für $n \rightarrow \infty$ gegen 0 konvergiert:

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \text{var}(U_n) = 0$$

Die Varianz ist definiert als

$$\text{var}(U_n) := E[(U_n - E(U_n))^2],$$

wobei E den Erwartungswert der Abschätzung bezeichnet.

Definition 5.3:

Eine Schätzfunktion U_n heißt erwartungstreu, wenn der Erwartungswert der Schätzfunktion gleich dem Parameterwert Q ist:

$$E(U_n) = Q$$

Für die Frequenzauswertung der in dieser Arbeit beschriebenen Sarkomeroszillationen erwies sich die Methode der Abschätzung des Leistungsdichtespektrums als adäquates Verfahren. Das Leistungsdichtespektrum entspricht der quadrierten Fouriertransformation $X(e^{j\omega})$ (ω = Frequenz) der Zeitfunktion $f(t)$:

$$(1) \quad L(\omega) = |X(e^{j\omega})|^2 = \left| \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-j\omega t} dt \right|^2$$

Das Leistungsdichtespektrum einer endlichen Meßwertfolge $x(n)$ läßt sich in erster Näherung durch ein Periodogramm $I_N(\omega)$ beschreiben (s. 2.3.2):

$$(2) \quad I_N(\omega) = \frac{1}{N} |X(e^{j\omega})|^2$$

$I_N(\omega)$ ist jedoch keine konsistente Schätzfunktion des Leistungsdichtespektrums (Oppenheim & Schafer, 1978). Die Autoren zeigen, daß dennoch die Methode der Mittelung von Periodogrammen konsistent ist. Das Verfahren soll hier deshalb im Einzelnen dargestellt werden.

Die Abschätzung des Leistungsdichtespektrums ist definiert als Mittelwert der K Periodogramme ($I_M^{(i)}$):

$$(3) \quad B(\omega) = \frac{1}{K} \sum_{i=1}^K I_M^{(i)}(\omega) \quad \text{mit } N = K \cdot M$$

Die Varianz von $B(\omega)$ berechnet sich nach Oppenheim und Schafer (1978) als

$$(4) \quad \text{var } B(\omega) = \frac{1}{K} \text{var}[I_M(\omega)] = \frac{1}{K} L^2(\omega) \left[1 + \left(\frac{\sin(\omega M)}{M \sin(\omega)} \right)^2 \right],$$

wobei $L(\omega)$ das Leistungsdichtespektrum der Grundgesamtheit bezeichnet.

Aus Gleichung (4) ist ersichtlich, daß die Varianz von $B(\omega)$ gegen 0 konvergiert, wenn die Anzahl K hinreichend groß wird. $B(\omega)$ ist nach Korollar 5.2 folglich eine konsistente Schätzfunktion der Meßwertreihe $x(n)$.

Oppenheim und Schafer (1978) weisen weiterhin nach, daß das Verfahren der Mittelung von Periodogrammen nicht erwartungstreu ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Oszillatorische Phänomene wurden in intakten und enthäuteten Skelettmuskelfasern des *M. semitendinosus* des Grasfrosches (*Rana temporaria* L.) untersucht. In diesem Zusammenhang wurde eine endogene Modulatorsubstanz isoliert, die ihrerseits die oszillatorische Aktivität verstärkte.

2. Oszillationen der isometrischen Kraftentwicklung wurden über ein konventionelles mechano-elektrisches Meßsystem ausgezeichnet; Oszillationen einzelner Sarkomere, die unterhalb der Meßschwelle des Systems lagen, wurden mit der Laserlichttechnik registriert. Die Frequenzanalyse der Signale erfolgte rechnergestützt über ein Programm zur Mittelung von Periodogrammen. Die Versuchstemperatur betrug 10 °C.

3. Koffein induzierte in einer Konzentration von 2 mM in der intakten Skelettmuskelfaser eine unter der Kontraktionsschwelle liegende Aktivierung einzelner Sarkomere in Form sog. Sarkomeroszillationen. Die Frequenz dieser Oszillationen verhielt sich über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde stabil und betrug maximal 2 s^{-1} .

Gleiche Effekte ließen sich durch Koffein-ähnliche Methylxanthine (0,5 mM 1,7-Dimethylxanthin, 3 mM 1-Methyl-3-isobutylxanthin) auslösen. N-methylierte Xanthine, die eine Methylgruppe in der 9-Position trugen, waren unwirksam.

4. Die oszillatorische Aktivität variierte mit der Temperatur und der Sarkomerlänge. Oberhalb von 15 °C ließ sich das Phänomen nicht mehr reproduzierbar auslösen. Die Frequenz der Oszillationen nahm bis zu einer Sarkomerlänge von 2,6 - 2,7 µm zu, während bei einer stärkeren Streckung der Präparate wiederum eine Abnahme der Frequenz zu verzeichnen war.

5. Die Sarkomeroszillationen traten unabhängig vom Membranpotential auf. Sie wurden sowohl in hyperpolarisierten als auch in depolarisierten und mechanisch refraktären Fasern beobachtet.

tet.

6. Der Ca-Antagonist D-600 (30 μM), der in den potentialabhängigen ersten Schritt des elektro-mechanischen Kopplungsprozesses eingreift, hatte keinen Einfluß auf die Sarkomeroszillationen. Dagegen hemmten Pharmaka (12 μM Dantrolen, 2 μM Ryanodin), die mit der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) interferieren, die Oszillationen.

7. In Muskelfasern, von denen das Sarkolemma mechanisch entfernt wurde (enthäutete Präparate), ließen sich sowohl überschwellige Kraftoszillationen wie auch unterschwellige Sarkomeroszillationen induzieren.

8. In enthäuteten Fasern verursachte Koffein (2mM) bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung von 8×10^{-7} M Oszillationen der isometrischen Kraft. Der gleiche Effekt trat auch in nominell Ca^{2+} -freien Lösungen ($\text{pCa} \geq 8$) auf, sofern die Koffeinkonzentration auf ≥ 5 mM erhöht wurde.

9. Unter Versuchsbedingungen, bei denen die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR erleichtert war (Reduktion der freien Mg^{2+} -Konzentration von 1,0 auf 0,1 mM), ließ sich der gleiche Effekt in enthäuteten Fasern auch allein durch Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration der Badlösung erzielen. Ca^{2+} (8×10^{-7} M) induzierte in Abhängigkeit von der Höhe der freien EGTA-Konzentration sowohl Kraft- wie auch Sarkomeroszillationen.

10. Sowohl die Ca^{2+} - als auch die Koffein-induzierten Oszillationen traten nicht mehr auf, wenn die Membranen des SR's durch eine Detergenzienbehandlung zerstört wurden.

11. Vom oszillierenden Muskel wurde ein niedermolekulares Material mit einem Absorptionsmaximum bei 215 nm freigesetzt, welches seinerseits die oszillatorische Aktivität verstärkte. Zur Isolierung dieses Materials wurden für jede Aufarbeitung acht ganze Muskelpräparate jeweils zwei Stunden lang in einer

Ringerlösung, die 2 mM Koffein enthielt, inkubiert. Für die weiteren Aufreinigungsschritte wurde die Badlösung anschließend aufgenommen und im Rotationsverdampfer eingengt.

12. Die Abtrennung des ebenfalls in der Badlösung enthaltenen Koffeins erfolgte durch eine Elution über eine Sephadex G-10 - Säule. Für die weitere Aufreinigung wurden die Fraktionen, die das freigesetzte Material enthielten, gesammelt und wiederum eingengt.

13. Durch zwei Elutionen in unterschiedlichen Puffersystemen über eine präparative RP-18 - HPLC-Säule gelang es, das zu untersuchende Material in fünf Komponenten zu spalten. Lediglich eine Komponente erwies sich als aktiv. Das aktive Material induzierte abhängig von der Ca^{2+} -Pufferung des Lösungssystems sowohl Kraft- wie auch Sarkomeroszillationen. Beide Oszillationstypen traten nach Zerstörung der SR-Membranen nicht mehr auf.

14. Die Aminosäure-Analyse ergab, daß die aktive Komponente Peptidmaterial enthielt. Das isolierte Peptid setzt sich aus 20 - 21 Aminosäuren oder einem Vielfachen dieser Anzahl zusammen, wobei die Aminosäuren Glutaminsäure mit 3, Serin mit ebenfalls 3 und Glycin mit 5 Anteilen dominierten. Der durchgeführte Phosphattest ergab eine schwach positive Reaktion.

15. Die Ergebnisse werden im Rahmen der Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum diskutiert. Es konnte indirekt gezeigt werden, daß die beschriebenen oszillatorischen Phänomene durch eine zyklische Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR verursacht werden. Aufgrund der Parallelität zur Koffein- und Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung ist anzunehmen, daß das vom oszillierenden Muskel freigesetzte Material eine modulierende Wirkung auf den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} - "release" ausübt, indem es die Ca^{2+} -Freisetzung potenziert.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ADRIAN, R. H. (1956):

The effect of internal and external potassium on the membrane potential of frog muscle.

J. Physiol. 133, 631 - 658

ALLEN, D. G., EISNER, D. A. & ORCHARD, C. H. (1984):

Characterization of oscillations of intracellular calcium concentration in ferret ventricular muscle.

J. Physiol. 352, 113 - 128

AMES, B. N. & DUBIN, D. T. (1960):

The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid.

J. Biol. Chem. 235, 769 - 775

ARMSTRONG, C. F., HUXLEY, A. F. & JULIAN, F. J. (1966):

Oscillatory responses in frog skeletal muscle fibres.

J. Physiol. 186, 26 - 27P

ASHLEY, C. C., GRIFFITHS, P. J., LEA, T. J. & TREGGAR, R. T. (1985):

Does inositol trisphosphate induce tension development in skinned muscle fibres of barnacle and frog?

J. Physiol. 369, 185P

ASHLEY, C. C. & MOISESCU, D. G. (1977):

Effect of changing the composition of the bathing solutions upon the isometric tension-pCa relationship in bundles of crustacean myofibrils.

J. Physiol. 270, 627 - 652

AXELSSON, J. & THESLEFF, S. (1958):

Activation of the contractile mechanism in striated muscle.

Acta Physiol. Scand. 44, 55 - 66

BASKIN, R. J., ROOS, K. P. & YEH, Y. (1979):

Light diffraction study of single muscle fibers.

Biophys. J. 28, 45 - 64

BEAVO, J. A., ROGERS, N. L., CROFFORD, O. B., BAIRD, C. E.,

HARDMAN, J. G., SUTHERLAND, E. W. & NEWMAN, E. V. (1971):

Effects of phosphodiesterase inhibitors on cyclic AMP levels and lipolysis.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 185, 129 - 136

BERWE, D., GOTTSCHALK, G. & LÜTTGAU, H. C. (1987):

Effects of the calcium antagonist gallopamil (D600) upon excitation-contraction coupling in toe muscle fibres of the frog.

J. Physiol. 385, 693 - 707

- BIANCHI, C. P. (1962):
Kinetics of radiocaffeine uptake and release in frog
sartorius.
J. Pharmac. Exp. Ther. 138, 41 - 47
- BIANCHI, C. P. (1968):
Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in
striated muscle.
Fed. Proc. 27, 126 - 131
- BOGERT, B. P., HEALY, M. J. & TUKEY, J. W. (1963):
The Quefrency analysis of time series for echoes: cepstrum,
pseudo-autocovariance, cross-cepstrum, and saphe cracking in
time series analysis, ed. J. Wiley & Sons. M. Rosenblatt, New
York
- BRAGG, W. L. (1913):
The structure of some crystals as indicated by their diffraction
of X-rays.
Proc. R. Soc. A 89, 248 - 277
- BUTCHER, R. W. & SUTHERLAND, E. W. (1962):
Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials.
J. Biol. Chem. 237, 1244 - 1250
- CAPUTO, C., GOTTSCHALK, G. & LÜTTGAU, H. C. (1981):
The role of contraction activation by the membrane potential.
Experientia 37, 580 - 581
- CARAFOLI, E. & PENNISTON, J. T. (1985):
The calcium signal.
Scientific Am. 253, 50 - 58
- CHANDLER, W. K., RAKOWSKI, R. F. & SCHNEIDER, M. F. (1976):
A non-linear voltage dependent charge movement in frog skeletal
muscle.
J. Physiol. 254, 245 - 283
- CHAPMAN, R. A. & MILLER, D. J. (1974):
Structure-activity relations for caffeine: a comparative study
of the inotropic effects of the methylxanthines, imidazoles
and related compounds on the frog's heart.
J. Physiol. 242, 615 - 634
- COSTANTIN, L. L. & TAYLOR, S. R. (1973):
Graded activation in frog muscle fibers.
J. Gen. Physiol. 61, 424 - 443
- DANKO, S., KIM, D., H., SRETER, F. A. & IKEMOTO, N. (1985):
Inhibitors of Ca^{2+} release from the isolated sarcoplasmic
reticulum. II. The effects of dantrolene on Ca^{2+} release
induced by caffeine, Ca^{2+} and depolarization.
Biochim. Biophys. Acta 816, 18 - 24

DAWSON, R., STEVES, J. P., LORDEN, J. F. & OPARIL, S. (1985):
Reverse-phase separation and electrochemical detection of neu-
ropeptides.

Peptides 6, 1173 - 1178

DE BOLD, A. J. (1985):

Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart.

Science 230, 767 - 770

DELAY, M., RIBALET, B. & VERGARA, J. (1986):

Caffeine potentiation of calcium release in frog skeletal
muscle fibres.

J. Physiol. 375, 535 - 559

DE MELLO, W. C. (1973):

Membrane sealing in frog skeletal muscle fibers.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 982 - 984

DESMEDT, J. E. & HAINAUT, K. (1979):

Dantrolene and A23187 ionophore: specific action on calcium
channels revealed by the aequorin method.

Biochem. Pharmac. 28, 957 - 964

DÖRRSCHEIDT-KÄFER, M. (1976):

The action of Ca^{2+} , Mg^{2+} and H^{+} on the contraction threshold
of frog skeletal muscle.

Pflügers Arch. 362, 33 - 41

DUYSENS, L. N. M. & AMESZ, J. (1957):

Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine
nucleotide in intact cells in the near-ultraviolet and vi-
sible region.

Biochim. Biophys. Acta 24, 19 - 26

EBASHI, S., ENDO, M. & OHTSUKI, I. (1969):

Control of muscle contraction.

Quart. Rev. Biophys. 2, 351 - 384

EISENBERG, R. S., MCCARTHY, R. T. & MILTON, R. L. (1983):

Paralysis of frog skeletal muscle fibres by the calcium
antagonist D-600.

J. Physiol. 341, 495 - 505

ELLIS, K. O. & BRYANT, S. H. (1972):

Excitation-contraction uncoupling in skeletal muscle by
dantrolene sodium.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 107 - 109

ENDO, M. (1975):

Mechanism of action of caffeine on the sarcoplasmic reticulum
of skeletal muscle.

Proc. Japan Acad. 51, 479 - 484

ENDO, M. (1977):

Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.

Physiol. Rev. 57, 71 - 108

ENDO, M. & IINO, M. (1980):

Specific perforation of muscle cell membranes with preserved SR functions by saponin treatment.

J. Muscle Res. Cell. Mot. 1, 89 - 100

ENDO, M., TANAKA, M. & OGAWA, Y. (1970):

Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres.

Nature 228, 34 - 36

EPSTEIN, I. R., KUSTIN, K., DE KEPPER, P. & ORBAN, M. (1983):

Oscillating chemical reactions.

Scientific Am. 248, 96 - 108

EWALD, P. P. (1921):

Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie.

Z. Kristallographie 56, 129 - 156

FABIATO, A. (1983):

Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum.

Am. J. Physiol. 245, C1 - C14

FABIATO, A. (1985a):

Spontaneous versus triggered contractions of "calcium-tolerant" cardiac cells from the adult rat ventricle.

Basic Res. Cardiol. 80, Suppl. 2, 83 - 88

FABIATO, A. (1985b):

Effects of ryanodine in skinned cardiac cells.

Fed. Proc. 44, 2970 - 2976

FABIATO, A. & BAUMGARTEN, C. M. (1984):

Methods for detecting calcium release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells and the relationships between calculated transsarcolemmal calcium movements and calcium release. In: Function of the heart in normal and pathological states, ed. N. Sperelakis. Nijhoff, The Hague, The Netherlands

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1973):

Activation of skinned cardiac cells.

Europ. J. Cardiol. 1, 143 - 155

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1975):

Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.

J. Physiol. 249, 469 - 495

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1976):

Techniques of skinned cardiac cells and of isolated cardiac fibers with disrupted sarcolemmas.

Rec. Adv. in Studies on Cardiac Structure and Metabolism 9, 71 - 94

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978a):

Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles.

J. Physiol. 276, 233 - 255.

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1978b):

Myofilament-generated tension oscillations during partial calcium activation and activation dependence of the sarcomere length-tension relation of skinned cardiac cells.

J. Gen. Physiol. 72, 667 - 699

FABIATO, A. & FABIATO, F. (1979):

Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells.

J. Physiol., Paris, 75, 463 - 505

FEHER, J. J. & LIPFORD, G. B. (1985):

Mechanism of action of ryanodine on cardiac sarcoplasmic reticulum.

Biochim. Biophys. Acta 813, 77 - 86

FINK, R. H. A., STEPHENSON, D. G. & WILLIAMS, D. A. (1986):

Potassium and ionic strength effects on the isometric force of skinned twitch muscle fibres of the rat and toad.

J. Physiol. 370, 317 - 337

FISZ, M. (1966):

Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik, ed.

H. Grell, K. Maruhn & R. Rinow. VEB, Berlin

FLECKENSTEIN, A. (1971):

Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions.

In: Calcium and the heart, pp. 135 - 188, ed. P. Harris & L. Opie. Academic Press, London, New York

FLECKENSTEIN, A. (1977):

Pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17, 149 - 166

FORD, L. E. & PODOLSKY, R. J. (1972):

Intracellular calcium movements in skinned muscle fibres.

J. Physiol. 223, 21 - 33

FRANCK, U. F. (1978):

Chemische Oszillationen.

Angew. Chemie 90, 1 - 16

GORDON, A. M., HUXLEY, A. F. & JULIAN, F. J. (1966):

The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibres.

J. Physiol. 184, 170 - 192

- HASSELBACH, W. (1953):
Giftwirkungen auf den Arbeitszyklus der Fasermolekels.
Z. Naturf. 8b, 212 - 214
- HEINRIKSON, R. L. & MEREDITH, S. C. (1984):
Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid
chromatography: precolumn derivatization with phenylisothio-
cyanate.
Anal. Biochem. 136, 65 - 74
- HERRMANN, A. (1986):
Caffeine-induced sarcomeric oscillations in skeletal muscle
fibres of the frog.
J. Physiol. 378, 106P
- HERRMANN, A. (1987):
Activation of skeletal muscle by an endogenous factor.
Pflügers Arch. 408, R80
- HESS, B. & BOITEUX, A. (1968):
Regulatory functions of biological membranes, ed. J. Järne-
felt. Elsevier, Amsterdam, London, New York
- HESS, B. & BOITEUX, A. (1971):
Oscillatory phenomena in biochemistry.
Ann. Rev. Biochem. 40, 237 - 258
- HODGKIN, A. L. & HOROWICZ, P. (1960):
Potassium contractures in single muscle fibres.
J. Physiol. 153, 386 - 403
- HOWELL, S., JONES, D. A. & MAYOR, S. J. (1981):
The action of caffeine and related compounds on skeletal
muscle.
J. Physiol. 317, 24 - 25P
- HUXLEY, A. F. & NIEDERGERKE, R. (1958):
Measurement of the striations of isolated muscle fibres with
the interference microscope.
J. Physiol. 144, 403 - 425
- IMAI, K., BÖHLEN, P., STEIN, S. & UDENFRIEND, S. (1974):
Detection of fluorescamine-labeled amino acids, peptides, and
other primary amines on thin-layer chromatograms.
Arch. Biochem. Biophys. 161, 161 - 163
- IWAZUMI, T. & POLLACK, G. H. (1981):
The effect of sarcomere non-uniformity on the sarcomere
length-tension relationship of skinned fibres.
J. Cell Physiol. 106, 321 - 337
- JENDEN, D. J. & FAIRHURST, A. S. (1969):
The pharmacology of ryanodine.
Pharmacol. Rev. 21, 1 - 25

- KASS, R. S. & TSIEN, R. W. (1982):
Fluctuations in membrane current driven by intracellular calcium in cardiac Purkinje fibers.
Biophys. J. 38, 259 - 269
- KIRINO, Y. & SHIMIZU, H. (1982):
 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from fragmented sarcoplasmic reticulum: a comparison with skinned muscle fiber studies.
J. Biochem. 92, 1287 - 1296
- KONISHI, M. & KURIHARA, S. (1987):
Effects of caffeine on intracellular calcium concentration in frog skeletal muscle fibres.
J. Physiol. 383, 269 - 283
- KONISHI, M., KURIHARA, S. & SAKAI, T. (1985):
Change in intracellular calcium ion concentration induced by caffeine and rapid cooling in frog skeletal muscle fibres.
J. Physiol. 365, 131 - 146
- KOREY, S. (1950):
Some factors influencing the contractility of a non-conducting fibre preparation.
Biochim. Biophys. Acta 4, 58 - 67
- KORT, A. A., LAKATTA, E. G., MARBAN, E., STERN, M. D. & WIER, W. G. (1985):
Fluctuations of intracellular calcium concentration and their effect on tonic tension in canine cardiac Purkinje fibres.
J. Physiol. 367, 291 - 308
- KOVACS, L. & SCÜCS, G. (1983):
Effect of caffeine on intramembrane charge movement and calcium transients in cut skeletal muscle fibres of the frog.
J. Physiol. 341, 559 - 578
- KUMBARACI, N. M. & NASTUK, W. L. (1982):
Action of caffeine in excitation-contraction coupling of frog skeletal muscle fibres.
J. Physiol. 325, 195 - 211
- LAKATTA, E. G., CAPOGROSSI, M. C., KORT, A. A. & STERN, M. D. (1985):
Spontaneous myocardial calcium oscillations: overview with emphasis on ryanodine and caffeine.
Fed. Proc. 44, 2977 - 2983
- LEUNG, A. F. (1984):
Fine structures in the light diffraction pattern of striated muscle.
J. Muscle Res. Cell. Mot. 5, 535 - 558
- LOPEZ, J. R., ALAMO, L., CAPUTO, C., DI POLO, R. & VERGARA, J. (1986):
Determination of ionic calcium in frog skeletal muscle fibers.
Biophys. J. 43, 1 - 4

LÜTTGAU, H. C. (1965):

The effect of metabolic inhibitors on the fatigue of the action potential in single muscle fibres.

J. Physiol. 178, 45 - 67

LÜTTGAU, H. C. & OETLIKER, H. (1968):

The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres.

J. Physiol. 194, 51 - 74

LÜTTGAU, H. C. & SPIECKER, W. (1979):

The effects of calcium deprivation upon mechanical and electrophysiological parameters in skeletal muscle fibres of the frog.

J. Physiol. 296, 411 - 429

LUNDBLAD, A., GONZALEZ-SERRATOS, H., INESI, G., SWANSON, J. & PAOLINI, P. (1986):

Patterns of sarcomere activation, temperature dependence, and effect of ryanodine in chemically skinned cardiac fibers.

J. Gen. Physiol. 87, 885 - 905

MATHIAS, R. T., LEVIS, R. A. & EISENBERG, R. S. (1980):

Electrical models of excitation-contraction coupling and charge movement in skeletal muscle.

J. Gen. Physiol. 76, 1 - 31

MARCO, L. A. & NASTUK, W. L. (1968):

Sarcomeric oscillations in frog skeletal muscle fibres.

Science 161, 1357 - 1358

MARTINEZ, J. & POTIER, P. (1986):

Peptide hormones as prohormones.

TIPS 4, 139 - 147

MEISSNER, G. (1986):

Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum.

J. Biol. Chem. 261, 6300 - 6306

MELZER, W., SCHNEIDER, M. F., SIMON, B. J. & SZÜCS, G. (1986):
Intramembrane charge movement and calcium release in frog skeletal muscle.

J. Physiol. 373, 481 - 511

MEYER, H. E. (1987):

Quantitative determination of phosphoserine by PTC-amino acid analysis after modification to S-ethyl-cysteine.

In Vorbereitung

MILLER, D. J. & THIELECZEK, R. (1977):

Calcium release by caffeine and other methylxanthines in skinned skeletal muscle fibres.

J. Physiol. 273, 67 - 68P

MOISESCU, D. G. & THIMLECEK, R. (1978):

Calcium and strontium concentration changes within skinned muscle preparations following a change in the external bathing solution.

J. Physiol. 275, 241 - 262

MOORE, G. J. (1982):

III. Reversed phase high pressure liquid chromatography for the identification and purification of neuropeptides.

Life Sci. 30, 995 - 1002

MOSS, R. L. (1979):

Sarcomere length-tension relations of frog skinned muscle fibres during calcium activation at short lengths.

J. Physiol. 292, 177 - 192

NATORI, R. (1954):

The property and contraction process of isolated myofibrils.

Jikeikai Med. J. 1, 119 - 126

NATORI, R. (1965):

Propagated contractions in isolated sarcolemma-free bundles of myofibrils.

Jikeikai Med. J. 12, 214 - 221

NEEDLEMAN, P. (1986):

The expanding physiological roles of atrial natriuretic factor.

Nature 321, 199 - 200

NOIREAUD, J. & LEOTY, C. (1984):

Effects of ryanodine and iodoacetamide on normal and dystrophic C57 BL mouse diaphragm muscles.

Biomed. Res. 5, 329 - 333

OGAWA, Y. (1970):

Some properties of frog fragmented sarcoplasmic reticulum with particular reference to its response to caffeine.

J. Biochem. 67, 667 - 683

ONISHI, S. T. (1979):

Calcium-induced calcium release from fragmented sarcoplasmic reticulum.

J. Biochem. 86, 1147 - 1150

ONISHI, S. T., TAYLOR, S. & GRONERT, G. A. (1983):

Calcium-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum of pigs susceptible to malignant hyperthermia.

FEBS Lett. 161, 103 - 107

OPPENHEIM, A. V. & SCHAFER, R., W. (1978):

Digital signal processing.

Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey

ORCHARD, C. H., EISNER, D. A. & ALLEN, D. G. (1983):
Oscillations of intracellular Ca^{2+} in mammalian cardiac
muscle.
Nature 304, 735 - 738

PEACHEY, L. D. & EISENBERG, B. R. (1978):
Helicoids in the T-system and striations of frog skeletal
muscle fibres seen by high voltage electron microscopy.
Biophys. J. 22, 145 - 154

RÜDEL, R. & ZITE-FERENCZY, F. (1979):
Interpretation of light diffraction by cross-striated muscle
as Bragg reflexion of light by the lattice of contractile
proteins.
J. Physiol. 290, 317 - 330

RÜDEL, R. & ZITE-FERENCZY, F. (1980):
Efficiency of light diffraction by cross-striated muscle fi-
bers under stretch and during isometric contraction.
Biophys. J. 30, 507 - 516

SANDOW, A. (1936):
Diffraction patterns of the frog sartorius and sarcomere be-
haviour under stretch.
J. Cell. Comp. Physiol. 9, 37 - 54

SANDOW, A. (1965):
Excitation-contraction coupling in skeletal muscle.
Pharmacol. Rev. 17, 265 - 320

SCHERER, N. M. & FERGUSON, J. E. (1985):
Inositol 1,4,5-trisphosphate is not effective in releasing cal-
cium from skeletal sarcoplasmic reticulum microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 1064 - 1070

SCHIPPERS, V. (1985):
Entwicklung eines Meßdatenerfassungssystems für elektrophysio-
logische Versuche.
Diplomarbeit, Abt. für Elektrotechnik, Ruhr-Universität
Bochum.

SCHNEIDER, M. F. & CHANDLER, W. K. (1973):
Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possi-
ble step in excitation-contraction coupling.
Nature 242, 244 - 246

SENGUPTA, C., MEYER, U. A. & CARAFOLI, E. (1980):
Binding of dantrolene sodium to muscle intracellular
membranes.
FEBS Lett. 117, 37 - 38

SMITH, J. S., CORONADO, R. & MEISSNER, G. (1986):
Single channel measurements of the calcium release channel
from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.
J. Gen. Physiol. 88, 573 - 588

SORENSEN, M. M., COELHO, H. S. L. & REUBEN, J. P. (1986):
Caffeine inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers.
J. Membrane Biol. 90, 219 - 230

SPACKMANN, D. H., STEIN, W. H. & MOORE, S. (1958):
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids.
Anal. Chem. 30, 1190 - 1206

STEPHENSON, E. W. (1981a):
Activation of fast skeletal muscle: contributions of studies on skinned fibers.
Am. J. Physiol. 240, C1 - C19

STEPHENSON, E. W. (1981b):
Ca²⁺ dependence of stimulated ⁴⁵Ca efflux in skinned muscle fibers.
J. Gen. Physiol. 77, 419 - 443

STEPHENSON, E. W. & PODOLSKY, R. J. (1977):
Regulation by magnesium of intracellular calcium movement in skinned muscle fibers.
J. Gen. Physiol. 69, 1 - 16

STEPHENSON, D. G. & WENDT, I. R. (1987):
Length dependence of changes in sarcoplasmic calcium concentration and myofibrillar calcium sensitivity in striated muscle fibres.
J. Muscle Res. Cell. Mot., im Druck

STEPHENSON, D. G. & WILLIAMS, D. A. (1981):
Calcium activated force responses in fast- and slow-twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures.
J. Physiol. 317, 281 - 302

STEPHENSON, D. G. & WILLIAMS, D. A. (1982):
Effects of sarcomere length on the force-pCa relation in fast- and slow-twitch skinned muscle fibres from the rat.
J. Physiol. 333, 637 - 653

STERN, M. D., KORT, A. A., BHATNAGAR, G. M. & LAKATTA, E. G. (1983):
Scattered-light intensity fluctuations in diastolic rat cardiac muscle caused by spontaneous Ca²⁺-dependent cellular mechanical oscillations.
J. Gen. Physiol. 82, 119 - 153

SUTKO, J. L., ITO, K. & KENYON, J. L. (1985):
Ryanodine: a modifier of sarcoplasmic reticulum calcium release in striated muscle.
Fed. Proc. 44, 2984 - 2988

SUTKO, J. L. & WILLERSON, J. T. (1980):
Ryanodine alteration of the contractile state of rat ventricular myocardium.
Circ. Res. 46, 332 - 343

THIELECZEK, R. (1982):
Untersuchungen an der enthäuteten Skelettmuskelfaser des Frosches zur Aktivierbarkeit des kontraktile Systems und zur Ca^{2+} -Freisetzung und -Aufnahme des sarcoplasmatischen Reticulums.
Dissertation, Abt. für Biologie, Ruhr-Universität Bochum

THIELECZEK, R. & HEILMEYER, L. M. G. (1986):
Inositol 1,4,5-trisphosphate enhances Ca^{2+} -sensitivity of the contractile mechanism of chemically skinned rabbit skeletal muscle fibres.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 662 - 669

THORENS, S. & ENDO, M. (1975):
Calcium-induced calcium release and 'depolarization'-induced calcium release: their physiological significance.
Proc. Japan Acad. 51, 473 - 478

TSIEN, R. Y. (1980):
New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures.
Biochem. 19, 2396 - 2404

TSIEN, R. Y. (1983):
Intracellular measurements of ion activities.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 12, 91 - 116

TURNER, A. J. (1986):
Processing and metabolism of neuropeptides.
Essays Biochem. 22, 70 - 119

UNGEHEUER, M., MIGALA, A. & HASSELBACH, W. (1986):
Is the calcium pump involved in calcium release?
Z. Naturforsch. 41c, 647 - 651

VAN WINKLE, W. B. (1976):
Calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: site of action of dantrolene sodium?
Science 193, 1130 - 1131

VERGARA, J., TSIEN, R. Y. & DELAY, M. (1985):
Inositol 1,4,5-trisphosphate: a possible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6352 - 6356

VOLPE, P., SALVIATI, G., DI VIRGILIO, F. & POZZAN, T. (1985):
Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.
Nature 316, 347 - 349

- WALI, F. A. (1986):
Effects of anaesthetics on intracellular calcium ions in muscle.
Life Sci. 38, 1441 - 1443
- WEBER, A. M. (1968):
The mechanism of action of caffeine on sarcoplasmic reticulum.
J. Gen. Physiol. 52, 760 - 772
- WEBER, A. M. & HERZ, R. (1968):
The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum.
J. Gen. Physiol. 52, 750 - 759
- WEBER, A. M., HERZ, R. & REISS, I. (1969):
The role of magnesium in the relaxation of myofibrils.
Biochem. 8, 2266 - 2270
- WENDT, I. R. & STEPHENSON, D. G. (1983):
Effects of caffeine on Ca-activated force production in skinned cardiac and skeletal muscle fibres of the rat.
Pflügers Arch. 398, 210 - 216
- WHITE, M. D., COLLINS, J. G. & DENBOROUGH, M. A. (1983):
The effect of dantrolene on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum function in malignant hyperpyrexia in pigs.
Biochem. J. 212, 399 - 405
- WICKNER, W. T. & LODISH, H. F. (1985):
Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes.
Science 230, 400 - 407
- WIER, W. G., KORT, A. A., STERN, M. D., LAKATTA, E. G. & MARBAN, E. (1983):
Cellular calcium fluctuations in mammalian heart: direct evidence from noise analysis of aequorin signals in Purkinje fibers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7367 - 7371
- YEH, Y., BASKIN, R. J., LIEBER, R. L. & ROOS, K. P. (1980):
Theory of light diffraction by single skeletal muscle fibers.
Biophys. J. 29, 509 - 522
- ZIMMERMANN, R. & MEYER, D. I. (1986):
1986: A year of new insights into how proteins cross membranes.
TIBS 11, 512 - 515
- ZITE-FERENCZY, F., HÄBERLE, K.-D., RÜDEL, R. & WILKE, W. (1986):
Correlation between the light diffraction pattern and the structure of a muscle fibre realized with Ewald's construction.
J. Muscle Res. Cell Mot. 7, 197 - 214

Herrn Prof. Dr. H. Ch. Lüttgau danke ich für seine langfristige Unterstützung im Verlaufe meiner Arbeit. Er überließ mir das Thema dieser Arbeit und übernahm die wissenschaftliche Betreuung. Mit vielen nützlichen Anregungen und wertvollen Diskussionshilfen stand mir Dr. R. Thieleczek aus der medizinischen Fakultät zur Seite.

Des weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. P. Welzel für seine hilfreiche und freundliche Unterstützung. In Zusammenarbeit mit ihm wurde in seinem Labor in der Abteilung Chemie ein wesentlicher Teil der biochemischen Untersuchungen durchgeführt. Dr. H. Meyer aus der medizinischen Fakultät gab mir eine Einführung in die Aminosäure-Analyse und ermöglichte die Durchführung der Analysen.

Für das gute Arbeitsklima sorgten meine Kollegen und Kolleginnen. Insbesondere meinen Kollegen T. Böhle und R. Neuhaus danke ich für ihre Hilfe bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Annegret Herrmann

Geboren am	21. Dezember 1956 in Gelsenkirchen
Schulbesuch	1963 - 1967 Volksschule
	1967 - 1976 Gymnasium
	1976 Abitur
Studium und Ausbildung	1976 - 1982 Studium der Biologie und Mathematik an der Ruhr-Universität Bochum
	1981 - 1982 Staatsexamensarbeit bei Prof. Dr. H. Ch. Lüttgau am Lehrstuhl für Zellphysiologie der Ruhr-Universität Thema: Die Wirkung von Pharmaka auf die elektromechanische Kopplung
	1982 1. Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe II
	1983 1. Staatsprüfung für das Lehramt für die Sekundarstufe I
	seit 1983 Dissertation bei Prof. Dr. H. Ch. Lüttgau am Lehrstuhl für Zellphysiologie der Ruhr-Universität

